



วิทยานิพนธ์

ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน
และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ
(*Penaeus monodon* Fabricius)

Effects of β -glucan Supplementation on Expression of Immune-related Genes,
and Resistance Against *Vibrio harveyi* and White Spot Syndrome Virus in
Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

นางสาวจรรุวรรณ ชินกร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

Effects of β -glucan Supplementation on Expression of Immune-related Genes, and Resistance Against *Vibrio harveyi* and White Spot Syndrome Virus in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

นามผู้วิจัย นางสาวจรรุวรรณ ชินกร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรัตน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน
และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

(*Penaeus monodon* Fabricius)

Effects of β -glucan Supplementation on Expression of Immune-related Genes, and Resistance
Against *Vibrio harveyi* and White Spot Syndrome Virus in
Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

โดย

นางสาวจรรวรณ์ ชินกร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2550

จารุวรรณ ชินกร 2550: ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันและการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D. 117 หน้า

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันจำนวน 10 ชนิด ซึ่งได้แก่ Anti-microbial peptide, β -glucan binding protein, crustin, heat shock protein 70, lysozyme, peroxinectin, penaeidin, prophenoloxidase, serine proteinase inhibitor และ transglutaminase ในเม็ดเลือด หัวใจ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย เหงือก และเนื้อเยื่อใต้เปลือก ของกุ้งกุลาดำที่แข็งแรงขนาด 12 กรัม ด้วยวิธี Conventional RT-PCR พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่มีการแสดงออกมากในเซลล์เม็ดเลือด เหงือก หัวใจ และ ลำไส้ส่วนท้าย ตามลำดับ และการศึกษาผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหาร 3 ระดับคือ 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำขนาด 12.85±0.69 กรัม โดยใช้เทคนิค Conventional RT-PCR ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันบางชนิดของกุ้งกุลาดำมีการแสดงออกสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในบางช่วงเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ 1, 3 และ 14 ภายหลังจากที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัมให้กุ้งกินเป็นเวลา 14 วัน มีผลทำให้กุ้งกุลาดำสามารถต้านทานแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีอัตราการตายสะสม ในวันที่ 12 ภายหลังจากการได้รับเชื้อเป็น 55.6±8.6, 33.0±0.0, 72.2±17.2 และ 61.1±8.6 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารความเข้มข้น 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ให้กุ้งทดลองกินระยะเวลา 14 วัน สามารถโน้มนำทำให้กุ้งกุลาดำสามารถต้านทานต่อเชื้อ White spot syndrome virus (WSSV) ได้

Jaruwan Chinnakorn 2007: Effects of β -glucan Supplementation on Expression of Immune-related Genes, and Resistance Against *Vibrio harveyi* and White Spot Syndrome Virus in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Mr. Prapansak Srisapoome, Ph.D. 117 pages.

Expression analysis of ten immune-related genes (Anti-microbial peptide, β -glucan binding protein, crustin, heat shock protein 70, lysozyme, peroxinectin, penaeidin, prophenoxidase, serine proteinase inhibitor and transglutaminase), were investigated in haemocytes, heart, hepatopancreas, muscle, foregut, midgut, hindgut, gills, and subcuticular epithelium of a healthy black tiger shrimp (12 g body weight) using conventional RT-PCR. The high expression levels of these genes were observed in haemocytes, gills, heart and high gut, respectively. Effects of four different diets with 0, 1, 3 and 5 g of β -glucan/kg on expression levels of immune-related genes in haemocytes of black tiger shrimps (12.85 \pm 0.69 g body weight) were investigated at day 0, 1, 3, 7, 10 and 14 after feeding. Shrimps fed with 3 and 5 g of β -glucan/kg diet resulted in higher mRNA expression levels of some immune-related genes in some days, especially at day 1, 3 and 14. Efficacies of β -glucan supplemented diet on disease resistances were also evaluated. Supplemented feed with 3 and 5 g of β -glucan/kg diet showed higher performance in *V. harveyi* resistance. The accumulative percent mortality of these two shrimp groups was found to be significantly lower than those of control shrimps and shrimps fed with 1 g of β -glucan/kg diet ($P < 0.01$) by 55.6 \pm 8.6, 33.0 \pm 0.0, 72.2 \pm 17.2 and 61.1 \pm 8.6 %, respectively. On the other hand, no disease resistance of all β -glucan-consuming shrimps was observed when they were challenged with white spot syndrome virus (WSSV).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อ.ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภาภูมิ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร.นนทวิทย์ อารีรักษ์ และ ผศ.ดร.นิตติ ชูเชิด ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.อรพินท์ จินตสถาพร ประธานการสอบ และ อ.ดร.ปกรณ์ อุ้นประเสริฐ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก เป็นอย่างยิ่ง ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้ออกมาสมบูรณ์ด้วยความถูกต้อง

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนให้มีวิชา ขอขอบคุณเพื่อนพี่น้องทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือ ขออุทิศประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้แด่บิดา มารดา พี่ต๋น และน้องบ๊ิก ที่ให้โอกาสและเป็นกำลังใจสนับสนุนที่ดีเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของ โครงการวิจัยเรื่องผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหาร ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง และ ไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมและพัฒนาการวิจัยคณะ ประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จารุวรรณ ชินกร

กันยายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	25
อุปกรณ์	25
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	40
ผล	40
วิจารณ์	61
สรุป	85
ข้อเสนอแนะ	87
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ภาคผนวก	109
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กลุ่ม แหล่งที่มา และชนิดของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ	16
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Specific primers ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ	33
ตารางผนวกที่		
1	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในปริมาณต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i>	113
2	อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในปริมาณต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ White Spot Syndrome Virus	115

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของเบต้า-กลูแคน	16
2	ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)	23
3	การแสดงออกของยีน AMP, β GBP, Crustin, HSP70, Lysozyme, Peroxinectin, Penaeidin, ProPO, SPI, TGase และ β -actin ที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ 1; หัวใจ, 2; ตับและตับอ่อน, 3; เหงือก, 4; เนื้อเยื่อได้เปลือก, 5; ลำไส้ส่วนหน้า, 6; ลำไส้ส่วนกลาง, 7; ลำไส้ส่วนท้าย, 8; เม็ดเลือด, 9; กล้ามเนื้อ ในกุ้งกุลาดำปรกติ	40
4	น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่มีเบต้า-กลูแคนในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเริ่มต้นการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน	42
5	การแสดงออกของ β -actin ยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคน ในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	44
6	การแสดงออกของยีน HSP70 เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	45
7	การแสดงออกของยีน SPI เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	46
8	การแสดงออกของยีน Peroxinectin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารและได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	การแสดงผลของยีน TGase เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	48
10	การแสดงผลของยีน Lysozyme เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	49
11	การแสดงผลของยีน β GBP เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	50
12	การแสดงผลของยีน AMP เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	51
13	การแสดงผลของยีน Crustin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	52
14	การแสดงผลของยีน Penaeidin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	การแสดงผลของยีน ProPO เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน	54
16	อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับต่าง ๆ กัน ภายหลังจากการฉีดด้วยเชื้อ <i>V. harveyi</i> ในระยะเวลา 12 วัน	56
17	อัตราการตายของกุ้งกุลาดำปรกติภายหลังการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 วัน	57
18	อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับต่าง ๆ กัน ภายหลังจากการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ที่ความเข้มข้น 10^{-6} ของ Viral stock เป็นเวลา 14 วัน	59
19	ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ตัวอย่าง DNA ต้นแบบจาก DNA ซึ่งสกัดจากกุ้งทดลอง	60

ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

(*Penaeus monodon* Fabricius)

Effects of β -glucan Supplementation on Expression of Immune-related Genes, and Resistance Against *Vibrio harveyi* and White Spot Syndrome Virus in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

คำนำ

กุ้งกุลาดำจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย นับตั้งแต่มีการปรับเปลี่ยนระบบการเลี้ยงมาเป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (intensive) ในปี พ.ศ. 2531 ซึ่งพบว่ามีการปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในอัตราที่หนาแน่นต่อพื้นที่สูง มีการให้อาหารที่มากเกินไปทั้งปริมาณและคุณภาพ ผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วงสูงประมาณ 500 - 1,000 กิโลกรัม/ไร่ โดยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาประเทศไทยสามารถส่งกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็งและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ไปขายยังตลาดโลกด้วยปริมาณการผลิตประมาณ 200,000 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 60,000 ล้านบาท/ปี และจากการส่งออกผลผลิตอย่างต่อเนื่องได้ส่งผลให้ประเทศไทยกลายเป็นผู้นำในการส่งกุ้งกุลาดำและผลิตภัณฑ์ในตลาดโลกตั้งแต่ปี 2534 และยังคงครองความเป็นผู้นำในการส่งออกมาจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามผลของการเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนาได้ส่งผลให้ประสบปัญหานานาประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรคซึ่งจัดเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุด ทั้งที่มีสาเหตุมาจาก แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. เป็นกลุ่มของเชื้อโรคที่ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั้งในบ่อเลี้ยงและบ่ออนุบาล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *V. harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสง นอกจากนี้โรคไวรัสดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) ก็เป็นเชื้อโรคอีกชนิดหนึ่งที่สร้างความเสียหายมากที่สุดในการเลี้ยงกุ้งขนาดใหญ่ โดยก่อให้เกิดความเสียหายอย่างกว้างขวาง ต่อเนื่องยาวนานมาจนถึงปัจจุบัน (ชโล และ พรเลิศ, 2547) เพื่อแก้ไขปัญหาการเกิดโรสดังกล่าว ยาปฏิชีวนะและสารเคมีนาชนิด ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายและได้มีความพยายามนำเอายาและสารเคมีชนิดใหม่ ๆ เข้ามาใช้ในการเพาะเลี้ยงและอนุบาลกุ้งเสมอ ๆ กอปรกับการขาดความรู้ที่ถูกต้องเกี่ยวกับการใช้ยาและสารเคมีของเกษตรกร จนส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาของแบคทีเรียทำให้การใช้ยาและสารเคมีบางตัวไม่ได้ผล ทั้งยังมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่มีประโยชน์ในธรรมชาติส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศของ

แหล่งน้ำตามธรรมชาติอีกด้วย นอกจากนี้ยาหรือสารเคมีบางตัวยังเกิดการตกค้างในตัวกุ้ง ส่งผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นสาเหตุให้ผู้นำเข้ากุ้งและผลิตภัณฑ์ยกเลิกการนำเข้า ส่งผลกระทบต่อธุรกิจที่เกี่ยวกับกุ้งกุลาดำทั้งระบบ

ในปัจจุบันการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบของจุลชีพ เช่น เบต้า-กลูแคนจากยีสต์ ไลโปโพลีแซคคาไรด์จากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ หรือ เปปติโดไกลัยแคนจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก มีแนวโน้มที่จะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้ต้านทานเชื้อที่ก่อโรคในกุ้งได้ (จิตชนัน, 2549) หากสามารถเข้าใจกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้ง ก็จะทำให้การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเบต้า-กลูแคนโดยการผสมอาหารเกิดความเหมาะสม สามารถลดอัตราการใช้ยาและสารเคมี รวมถึงต้นทุนการผลิตของเกษตรกรได้อีกทางหนึ่ง นอกจากนี้ยังจะเป็นการสร้างความสำเร็จให้กับประเทศผู้นำเข้าว่าสินค้ากุ้งทะเลของไทยปลอดภัยและสารเคมีตกค้าง เป็นมิตรและไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม อันจะนำไปสู่การพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืนต่อไป

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์โดยการผสมในอาหารแล้วทำการตรวจสอบระดับการตอบสนองของยีนในระบบภูมิคุ้มกัน (Immune-related gene) ของกุ้งกุลาดำ ซึ่งได้มีการศึกษาและค้นพบว่ามียีนที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันคล้ายกันกับที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) อื่น ๆ หลายชนิด เช่นเดียวกับแมลงหรือกุ้งชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้แก่ ยีนในกลุ่ม Prophenoloxidase (ProPO) system, Antimicrobial peptides (AMPs), Clotting proteins และ Pattern recognition proteins (PRPs) ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามการศึกษาการตอบสนองของยีนเหล่านี้ต่อการกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังมีจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกุ้งกุลาดำ นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมุ่งที่จะศึกษาผลของการได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*V. harveyi*) และเชื้อไวรัสดวงขาว ผลของการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการเป็นแนวทางการประยุกต์ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเบต้า-กลูแคนในอาหารของกุ้งกุลาดำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ
2. เพื่อศึกษาผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ
3. เพื่อศึกษาผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง (*V. harveyi*) และเชื้อไวรัสดวงขาว (White spot syndrome virus: WSSV) ในกุ้งกุลาดำ

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งกุลาดำ

1.1 ชีวิตวิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) จัดเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) ในกลุ่ม Crustaceans มีลักษณะทั่วไปที่สำคัญคือ มีหนวดหลายจางไม่เด่นชัด แก้มอยู่ในแนวระนาบและสันอยู่สองข้าง โคนกริยาวเกือบถึงฟันกริอันหลังสุด มีแนวเฉียงชี้ไปทางนัยน์ตา นอกจากนี้มีลักษณะลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางที่หลังประมาณ 9 ลาย กรีด้านบนมีฟัน 6 - 8 ซึ่งด้านล่างมี 2 - 4 ซึ่งขอบหางและขาว่ายน้ำมีขนาดเล็ก ๆ สีแดง ปลายขาเดินคู่ที่ 1 - 2 เป็นสีน้ำตาลเข้ม (ปกรณ, 2531) ซึ่งสามารถจัดลำดับทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Arthropoda

Subphylum Crustacea

Class Malacostraca

Order Decapoda

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae Rafinesque, 1815

Genus *Penaeus* Fabricius, 1798

Subgenus *Penaeus*

Species *monodon* (Brusca and Brusca, 1990)

1.2 สถานะการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในปัจจุบัน

การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย ได้เริ่มต้นจากการที่กรมประมงประสบความสำเร็จในการเพาะขยายพันธุ์กุ้งได้ในโรงเพาะฟักตั้งแต่ประมาณ พ.ศ. 2515 ทำให้เริ่มมีการนำลูกกุ้งไปปล่อยเลี้ยงในบ่อกุ้ง หรือนำกุ้งธรรมชาติเพื่อเพิ่มผลผลิตจากระดับ 40 - 50 กิโลกรัม/ไร่/ปี เป็นมากกว่า 200 กิโลกรัม/ไร่/ปี ตามลำดับ และได้พัฒนาต่อมาจนเป็นการเลี้ยงกุ้งโดยใช้พันธุ์กุ้งจากโรงเพาะฟักอย่างเดียวในช่วงประมาณ พ.ศ. 2525 โดยในระยษะนั้นยังคงเป็นการปล่อยกุ้งแบบไม่

หนาแน่นมากนัก (ประมาณ 15 - 20 ตัว/ตารางเมตร) ซึ่งได้ผลผลิตสูง ประกอบกับมีเทคโนโลยีจากประเทศไต้หวันเข้ามาสนับสนุน ทำให้การส่งออกกุ้งขยายตัวอย่างรวดเร็ว ราคากุ้งที่ขยับสูงขึ้นทำให้ผลประกอบการของแต่ละหน่วยธุรกิจที่เกี่ยวข้องสูง จึงมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วมากในระหว่างปี พ.ศ. 2528 - 2531 โดยมีการขยายตัวในแถบจังหวัดทางภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ฝั่งอ่าวไทย จากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของฟาร์มเลี้ยงทำให้มีผลผลิตออกมามาก จนทำให้ไม่สามารถหาตลาดส่งออกได้ทัน เนื่องจากโรงงานแปรรูปและห้องเย็นยังขยายตัวตามไม่ทัน ส่งผลให้เกิดภาวะกุ้งราคาตกเป็นครั้งแรกในช่วงปี พ.ศ. 2532 - 2533 หลังจากภาวะกุ้งราคาตกต่ำได้ไม่นาน ก็ประสบปัญหาการเกิดโรคไวรัสหัวเหลืองระบาดในพื้นที่ภาคกลาง โดยเฉพาะบริเวณ “สามสมุทร” คือสมุทรสาคร สมุทรสงคราม และสมุทรปราการ และได้ขยายไปในภาคตะวันออกและภาคใต้ตามลำดับ ในช่วงตั้งแต่ประมาณปี พ.ศ. 2533 - 2535 ในระยะนี้ได้มีการพัฒนาระบบและวิธีการเลี้ยงต่าง ๆ เพื่อลดปัญหาในเรื่องโรคระบาด โดยเริ่มมีการเลี้ยงกุ้งระบบปิด หรือระบบถายนํ้าน้อย การจัดการฟาร์มเริ่มเปลี่ยนมาเป็นการใช้ยาและเคมีภัณฑ์ในการแก้ปัญหามากขึ้น รวมถึงมีการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งในระบบปิดบริเวณพื้นที่ความเค็มต่ำเกิดขึ้นมามาก โดยเฉพาะแถบลุ่มนํ้าบางปะกง ในปี พ.ศ. 2536 ก็เกิดปัญหาการระบาดของโรคไวรัสชนิดใหม่คือ โรคตัวแดงดวงขาวขึ้นอีก ซึ่งโรคนี้ได้ทำความเสียหายเป็นบริเวณกว้างครอบคลุมในทุกพื้นที่การเลี้ยง ทั้งเขตความเค็มต่ำจนถึงความเค็มสูง ซึ่งโรคนี้ก็ยังคงทำความเสียหายให้กับการเลี้ยงกุ้งจนถึงในปัจจุบัน ในช่วงดังกล่าวจนถึงปัจจุบันระบบการเลี้ยงแบบต่าง ๆ ได้มีการพัฒนาหลากหลายมากขึ้น แต่ส่วนมากยังคงเป็นการเลี้ยงกุ้งแบบปิดหรือแบบถายนํ้าน้อย ยกเว้นในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งทะเลอันดามัน การเลี้ยงกุ้งแบบระบบปิดโดยใช้นํ้าหมุนเวียนเริ่มมีมากขึ้น โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ความเค็มต่ำ และได้เริ่มมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงแบบอิงธรรมชาติเกิดขึ้นต่อมาในปี พ.ศ. 2540 - 2541 ซึ่งเป็นช่วงหลังจากค่าเงินบาทลดต่ำทำให้ราคากุ้งสูงขึ้นมาก เกษตรกรมีรายได้สูงขึ้น ประกอบกับการเลี้ยงกุ้งในเขตพื้นที่ความเค็มต่ำประสบความสำเร็จสูง จึงมีการขยายตัวของการเลี้ยงกุ้งเขตพื้นที่ความเค็มต่ำหรือพื้นที่นํ้าจืดจนเกิดกระแสต่อต้าน จนกระทั่งรัฐบาลประกาศห้ามการเลี้ยงกุ้งกุลาดำระบบความเค็มต่ำในพื้นที่นํ้าจืดขึ้นในปี พ.ศ. 2541 การขยายตัวของการเลี้ยงกุ้งตั้งแต่ปี พ.ศ. 2541 ได้เพิ่มขึ้นอย่างมากในหลาย ๆ ประเทศทั่วโลก เนื่องจากราคากุ้งและผลตอบแทนที่สูงมาก ในขณะที่เดียวกันการเกิดโรคไวรัสดวงขาวได้ระบาดอย่างหนักในกลุ่มประเทศอเมริกากลางและอเมริกาใต้ ส่งผลให้ผลผลิตกุ้งทะเลจากกลุ่มประเทศดังกล่าวลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ราคากุ้งกุลาดำในประเทศไทยยังคงสูงต่อเนื่องจากในระยะปี พ.ศ. 2540 จนถึง พ.ศ. 2543 ทำให้เกษตรกรยังคงมีการขยายพื้นที่การเลี้ยงและพยายามเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่มากขึ้น (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

แต่อย่างไรก็ตามหากย้อนไปดูประสิทธิภาพการผลิตกุ้งในระยะตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 เป็นต้นมา จะพบว่าขนาดของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงได้จะมีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ และมีอัตราการเจริญเติบโตช้ามาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อสันนิษฐานหลายประการ เช่น การเลี้ยงในระบบปิดที่มีการปล่อยลูกกุ้งในความหนาแน่นสูงเกินไป การใช้พ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพต่ำ การใช้อาหารที่คุณภาพไม่เหมาะสม ตลอดจนความเสื่อมโทรมของสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ก็เป็นสาเหตุอีกประการหนึ่งที่หลาย ๆ ฝ่ายให้ความสนใจ จนกระทั่งปี พ.ศ. 2544 ราคากุ้งกุลาดำเริ่มลดต่ำลงเรื่อย ๆ จากผลผลิตกุ้งทะเลชนิดอื่นที่เพิ่มขึ้นทั่วโลกและผู้ซื้อเริ่มใช้มาตรการการตรวจสอบสารตกค้างในผลิตภัณฑ์กุ้ง ทำให้แนวโน้มราคาต่ำลงประกอบกับประสิทธิภาพการเลี้ยงที่ลดต่ำลงด้วย จึงเกิดภาวะวิกฤตกับอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งอย่างต่อเนื่องมาตั้งแต่ในปี พ.ศ. 2545 จนถึงในปัจจุบัน (ชโล, 2549)

2. โรคในกุ้งกุลาดำ

ปัญหาการเกิดโรคในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำของไทยจัดเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุด เนื่องจากได้สร้างความเสียหายอย่างหนักในทุกพื้นที่การเลี้ยง ทั้งที่มีสาเหตุมาจาก โปรโตซัว แบคทีเรียและไวรัส โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* และไวรัสดวงขาว นั้นถือเป็นเชื้อโรคที่มีความรุนแรง และทำให้เกิดการตายอย่างกว้างขวาง และสร้างความเสียหายต่อธุรกิจการเลี้ยงกุ้งทะเลจนถึงปัจจุบัน โรคที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัสที่สามารถพบได้ในกุ้งกุลาดำในประเทศไทยได้แก่

2.1 โรคแบคทีเรียเรืองแสงที่เกิดจากเชื้อ *V. harveyi*

โรคแบคทีเรียเรืองแสงส่วนใหญ่เป็นพวก *Vibrio* spp. ประกอบด้วย *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* และ *Vibrio* spp. (Mohney *et al.*, 1994; Prayitno and Latchford, 1995) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดโรคเรืองแสง และเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดความเสียหายมากกว่าเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ โดย *V. harveyi* จัดเป็นแบคทีเรียสกุล vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งสั้น เคลื่อนไหวด้วย Polar flagellum ผลิตเอนไซม์ Catalase, Cytochrome oxidase, Amylase, Gelatinase, Lipase และ Lecithinase สามารถย่อย Lysine และ Ornithine แต่ไม่สามารถย่อย Arginine ได้ ให้กรดจากการใช้ Cellobiose, Glucose, Sucrose, Trehalose, Fructose, Maltose, Raffinose และ Galactose แต่ไม่ให้กรดจากการใช้ Arabinose, Inosital และ Lactose สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศา

เซลล์เชื้อส แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ 5 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือ 1.6% (Austin and Austin, 1987) มีคุณลักษณะพิเศษ คือสามารถเรืองแสงเช่นเดียวกับแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *V. fischer* (Schemetter et al., 1986) และแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* บางสายพันธุ์ (Mohney et al., 1994) รวมถึง *V. splendidus* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้มีรายงานว่า เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้ (Lavilla-Pitogo et al., 1990) เชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* นี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำโดยเฉพาะฟาร์มที่เลี้ยงตามชายฝั่งทะเล โดยส่งผลให้มีปริมาณเม็ดเลือดในน้ำเลือดลดลง น้ำเลือดมีค่าความเป็นด่างมากขึ้น ค่าโปรตีนใน serum ลดลง นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการอักเสบของท่อตับ ท่อตับถูกทำลายเป็นเนื้อตาย มีเม็ดเลือดจำนวนมากมาล้อมรอบตัวเชื้อเอาไว้ (จรีพร และ กิจการ, 2530) นอกจากนี้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำแล้วยังมีผลต่อกุ้งแชบ๊วย โดยเฉพาะลูกกุ้งแชบ๊วยในระยะนอเพเลียส (คารุณี และคณะ, 2530)

นอกจากนี้ Prayitno and Latchford (1995) ได้รายงานการตายของกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในเกาะ Panny ประเทศฟิลิปปินส์ว่ามีสาเหตุจากแบคทีเรียเรืองแสงสกุลวibriโอ 2 ชนิดคือ *V. harveyi* และ *V. splendidus* โดยสามารถตรวจพบได้ในกุ้งและน้ำตัวอย่างที่เก็บจากพื้นที่ชายฝั่งซึ่งใช้ในการเพาะอนุบาล และจากการแช่ลูกกุ้งระยะต่าง ๆ ด้วยเชื้อวibriโอเรืองแสง ที่แยกได้จากกุ้ง Postlarva ที่เป็นโรคที่ระดับความเข้มข้น 10^2 และ 10^3 CFU/ml พบว่าลูกกุ้งทุกระยะมีอัตราการตายสูงกว่าลูกกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับการแช่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ภายใน 48 ชั่วโมง จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ยังพบว่ามียักษ์แบคทีเรียจำนวนมากบริเวณช่องปาก และอวัยวะในการกินอาหารในกุ้งที่ติดเชื้อขณะที่ปรกติไม่พบแบคทีเรียบริเวณดังกล่าว เช่นเดียวกับ Karunasagar et al. (1994) พบว่า *V. harveyi* เป็นสาเหตุการตายของลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนในประเทศอินเดีย ซึ่งมีอัตราการตายสูงถึง 70 - 90% โดยมีผลทำให้เกิดการตายอย่างรุนแรงทั้งในลูกกุ้งทุกระยะ และพบลูกกุ้งที่ป่วยจะแสดงอาการเรืองแสงออกมาให้เห็น เมื่อสังเกตโดยการใส่กล้องจุลทรรศน์ และสามารถตรวจพบแบคทีเรียได้จำนวนมากในบริเวณแองเลือดในตัวกุ้ง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ เศรษฐเกียรติ และคณะ (2533) ที่ได้รายงานว่าการพบเชื้อ *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* และ *V. vulnificus* ในตับและตับอ่อน รวมทั้งที่น้ำเลือดของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพ่อแม่พันธุ์กุ้งจะเป็นตัวแพร่เชื้อเข้าสู่บ่อฟักลูกกุ้งได้ ส่วนการศึกษาของ ลีลา และคณะ (2540) ได้ศึกษาโดยการตรวจเชื้อในลูกกุ้งกุลาดำ จากการศึกษารายการเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *V. alginolyticus*, *V. cholerae* (non-01), *V. damsela*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตับและตับอ่อน ถ้าใส่ และเลือดของกุ้งกุลาดำที่อายุ 30, 50, 70, 90 และ 120 วัน ซึ่งสอดคล้องกับ Ruangpan and Kitao (1991) ได้

ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Vibrio* ถึง 205 strains ในกุ้งกุลาดำป่วยระหว่างปี 1989 - 1990 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินอาจจะปนเปื้อนมากับลูกกุ้ง หรือมีอยู่แล้วในน้ำ

2.2 โรคไวรัสดวงขาว (White Spot Disease: WSD)

โรคไวรัสดวงขาวเกิดจากเชื้อ WSSV ไวรัสชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคในสัตว์หลายชนิดในกลุ่มของ Crustaceans รวมทั้งกุ้งและปู (Flegel, 1997; Shi *et al.*, 2000; Van Hulten and Vlask, 2001) มีการระบาดเกิดขึ้นครั้งแรกในบริเวณทางด้านตอนเหนือของทวีปเอเชีย ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น และไต้หวัน มีการแพร่กระจายออกไปยังส่วนต่าง ๆ ทั่วภูมิภาคของโลก โดยเฉพาะบริเวณทางด้านตะวันออกเฉียงใต้ของทวีปเอเชียและในทวีปอเมริกา (Hideaki *et al.*, 1993; Lotz, 1997; Van Hulten *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2001) ส่วนในประเทศไทยพบว่าเริ่มมีการระบาดของโรคชนิดนี้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 โดยพบว่ามีการระบาดของโรคนี้บริเวณภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศ ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547)

ลักษณะอาการของกุ้งที่เป็นโรคพบว่าในส่วนบริเวณของส่วนหัวและตามลำตัวจะมีลักษณะของจุดขาวหรือดวงขาวปรากฏอยู่ ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 2.0 มิลลิเมตร สาเหตุที่ทำให้กุ้งที่เป็นโรคมีลักษณะของดวงขาวบริเวณเปลือกปรากฏอยู่เนื่องมาจากเกิดการสะสมแคลเซียมและฟอสฟอรัสที่ผิดปกติ บางครั้งพบกุ้งมีอาการลอกคราบไม่ได้หรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว ตัวนุ่ม (ชลอ และ พรเลิศ, 2547; Lightner and Redman, 1998) กุ้งที่เป็นโรคนี้จะกินอาหารลดลง มักลอยขึ้นอยู่บริเวณผิวน้ำ หรือเกยอยู่บริเวณขอบบ่อ และมีอาการตัวแดง โดยในช่วงแรก ๆ ของการค้นพบ มีการเรียกชื่อโรคกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ว่า โรคตัวแดงดวงขาวหรือ Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) เพราะพบว่าไวรัสชนิดนี้ทำลายเซลล์ในเนื้อเยื่อที่กำเนิดมาจากส่วนของ Ectoderm และ Mesoderm (จิราพร และคณะ, 2538) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Jiang *et al.* (2006) ในกุ้ง *P. chinensis* ยังสามารถพบว่าไวรัสเข้าติดเชื้อในส่วนของเม็ดเลือดและเพิ่มจำนวนในส่วนของนิวเคลียสด้วย และอัตราการตายของโรคนี้มีสูงถึง 100% ภายใน 3 - 10 วัน นับตั้งแต่พบกุ้งที่แสดงอาการ (Lotz, 1997; Lightner and Redman, 1998; Wang *et al.*, 2000)

ในประเทศไทยการติดต่อและแพร่ระบาดของโรคนี้มักพบบ่อยครั้งในช่วงปลายปีที่มีอากาศหนาวเย็น ซึ่งจะพบว่ามี การตายของกึ่งมากกว่าช่วงอื่น ๆ เนื่องจากกึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็น เมื่ออุณหภูมิเย็นลง กึ่งจะอ่อนแอส่งผลทำให้กึ่งติดเชื้อไวรัสได้ง่าย และในช่วงเดือนตุลาคม - มกราคม เป็นช่วงมรสุมทำให้เรือประมงไม่สามารถออกไปจับแม่กึ่งจากทะเลน้ำลึกได้จึงต้องนำแม่กึ่งจาก ทะเลน้ำตื้นมาเพาะเลี้ยงแทน ซึ่งพบว่าแม่กึ่งที่นำมาจากทะเลน้ำตื้นมักตรวจพบว่ามี การติดเชื้อไวรัส ตัวแดงดวงขาวจึงทำให้ไข่และตัวอ่อนที่เพาะได้มีการปนเปื้อนและติดเชื้อไวรัสไปด้วย (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) ซึ่ง จิราพร และคณะ (2543) ได้รายงาน ว่า จากการศึกษาค้นคว้าความเป็นไปได้ที่เชื้อ ไวรัสตัวแดงดวงขาวจะสามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่พันธุ์กึ่งกุลาค่าไปยังลูกกึ่งในลักษณะ Vertical transmission โดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR), *in situ* hybridization และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการตรวจหาเชื้อไวรัส และสามารถพบเชื้อไวรัสในแม่กึ่ง ไข่กึ่ง และลูกกึ่ง จากแม่กึ่งที่มีการติดเชื้อ

จากการศึกษาของ Rojtinakorn *et al.* (2002) พบว่ามีโปรตีนหลายชนิดที่กึ่ง Kuruma สร้าง ขึ้นมาเพื่อตอบสนองขณะที่มีการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ได้แก่ ProPO, Coagulation factor G- β chain precursor, Factor D, Masquarade-like proteinase, Transglutaminase (TGase), Clottable protein และ โปรตีนในกลุ่ม Proteinase inhibitors อีก 8 ชนิด เช่น Antileukoproteinase, α -2-macroglobulin, Chelonianin และ Elastase inhibitor และ SP อีกสองชนิดคือ Kazal inhibitor และ Kunitz-type inhibitor และยังพบ AMPs ได้แก่ Bactinecin 11, Penaeidin-2 precursor และ Lysozyme c type นอกจากนี้ยังพบว่ามีโปรตีน Basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein, Natural killer enhancing factor (NK-EF), Integral membrane protein (CD34+), ESM-1, Notch homologue และ Drac homologue สำหรับ Adhesion proteins ได้แก่ β -integrin และ Cell adhesion molecule (CAM) collagens อีกสามชนิด ส่วน Proteinase inhibitors และ Tumour-related proteins พบในกึ่งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเท่านั้น โดยเฉพาะ apoptotic peptides จะแสดงออกในระดับ ที่สูงมากเมื่อกึ่งติดเชื้อ ซึ่งปรกติจะผลิตโปรตีนเหล่านี้เพียง 2.7% สำหรับกึ่งปรกติ และ 15.7% ขณะติดเชื้อ

2.3 โรคกุ้งโตช้าที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ Hepatopancreatic Parvo Virus (HPV) และ Monodon baculovirus (MBV)

ไวรัส HPV พบครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ (Chong and Loh, 1984) เป็นไวรัสชนิด ssDNA ในครอบครัว Parvoviridae มีรูปร่างหลากหลายไม่มีผนังหุ้ม (Sukhumsirichart *et al.*, 1999) กุ้งที่ป่วยเป็นโรคเมื่อตรวจสอบทางพยาธิสภาพพบว่าเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่ขึ้นและพบ inclusion body ย้อมติดสีน้ำเงิน (Lightner, 1996) ซึ่งกุ้งที่ติดเชื้อนี้จะทำให้เกิดการโตช้าเนื่องจากตับและตับอ่อน ถูกทำลายทำให้ไม่สามารถผลิตน้ำย่อยและสะสมอาหารได้ (ชโล และ พรเลิศ, 2547) ส่วนการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจาก MBV มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1981 (Lightner and redman, 1981) เป็นไวรัส dsDNA ในกลุ่ม occluded baculovirus เมื่อตรวจสอบทางพยาธิสภาพพบว่าเซลล์ตับและตับอ่อนที่ติดเชื้อไวรัสพบ occlusion body (Lightner, 1996) จากการศึกษาของ สุมนา (2535) ซึ่งทำการศึกษาการติดเชื้อไวรัส MBV ร่วมกับแบคทีเรียในกุ้งที่เลี้ยงอยู่เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถพบเชื้อ MBV ที่ตับและตับอ่อน ถึง (53 %) ส่วนการศึกษาของ Flegel *et al.* (1997) พบความสัมพันธ์ระหว่างการติดเชื้อไวรัส HPV กับอาการ โตช้าของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในฟาร์ม โดยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาและพบว่าความรุนแรงจะมากขึ้นถ้ามีการติดเชื้อร่วมกันระหว่าง MBV กับ HPV ต่อมา Flegel *et al.* (2001) ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับไวรัสชนิดนี้ในประเทศไทยพบว่ามีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิดร่วมกันคือ HPV และ MBV ในอัตราค่อนข้างสูง มีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตชะงักและกุ้งแคระแกร็น การติดเชื้อไวรัส HPV มีผลต่อกุ้งมากกว่าเชื้อไวรัส MBV และจากการตรวจการติดเชื้อด้วยวิธี PCR พบว่า 94% ของกุ้งกุลาดำที่ตรวจมีการติดเชื้อจากไวรัสชนิดเดียว และ 79% เป็นกุ้งที่มีการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด

2.4 โรคหัวเหลืองที่มีสาเหตุจากเชื้อ Yellow Head Virus (YHV)

ไวรัส YHV มีรายงานครั้งแรกในประเทศไทย (ชโล, 2534) จัดอยู่ใน Family Rhabdoviridae (Flegel *et al.*, 1997) เป็น RNA ไวรัสในกลุ่ม Rhabdovirus หรือ Coronavirus (Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Flegel *et al.* 1997) อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างลักษณะเป็นรูปแท่ง (Bacilli form) มีผนังหุ้ม (Envelope) ที่ล้อมรอบด้วย Knob-like projection เส้นผ่าศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร (nm) ยาว 150 - 170 nm ขนาดของคอร์ (Core) เท่ากับ 20 - 30 nm (สิทธิ และคณะ, 2535) เมื่อตรวจสอบทางพยาธิสภาพของกุ้งที่ติดเชื้อพบว่าเนื้อเยื่อที่มีต้นกำเนิดมาจากชั้น ectoderm และ Mesoderm ถูกทำลายเกิด Cytoplasmic inclusion ติดสีน้ำเงินจากการย้อมด้วยฮีมาท็อกซิลิน

และอีโอซิน (H&E) (Nash *et al.*, 1997) เม็ดเลือดบางเซลล์เกิดการตาย (Necrosis) และบางเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นผิดปกติ โดยเฉพาะในส่วนของนิวเคลียสซึ่งได้แก่ Pyknosis และ Karyorrhexis (พรเทพ, 2537; กรณีกา, 2543) นอกจากนี้ พรเทพ (2537) ยังพบว่าไวรัสหัวเหลืองสามารถมีชีวิตอยู่ในน้ำทะเลที่ความเค็มต่างกันเป็นระยะเวลา 12 - 24 ชั่วโมง และพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ และเม็ดเลือดกึ่งในระยะเวลา 24 - 42 ชั่วโมง หลังการฉีดเชื้อ โดยอาการยังคงปกติ การระบาดของโรคหัวเหลืองพบครั้งแรกในประเทศไทยในปี 2533 ในภาคกลาง และชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก และในปี 2537 พบการแพร่ระบาดในจังหวัด นครศรีธรรมราช สงขลา และปัตตานี และทำให้กุ้งกุลาดำตายอย่างรวดเร็วภายใน 3 - 7 วัน กุ้งที่ป่วยจะมีสีเหลืองบริเวณ cephalothorax (สีทิธิ และคณะ, 2535)

3. ระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย

ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งหรือปูหรือสัตว์ในกลุ่ม Crustacean นั้น จะมีระบบการตอบสนองและป้องกันตัวทางภูมิคุ้มกันแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไป เนื่องจากสัตว์ในกลุ่มนี้จะมีการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย ถึงแม้ว่าการศึกษาทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเลยังมีจำกัดเมื่อเทียบกับ ปู, Crayfish หรือกุ้ง Lobster (Aspan *et al.*, 1990; Hideaki *et al.*, 1993; Noga *et al.*, 1996; Soderhall and Cerenius, 1998; Smith *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามกุ้งในกลุ่ม Penaeidae โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นชนิดที่เริ่มมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทั่วโลกให้ความสำคัญ (Sritunyalucksana *et al.*, 1999; Sritunyalucksana *et al.*, 2001)

ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียมีความแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังคือระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มนี้ไม่มีระบบภูมิคุ้มกันแบบ Adaptive immune system อย่างแท้จริงในการจดจำต่อสิ่งแปลกปลอม สัตว์ในกลุ่มนี้มีเปลือกแข็ง และมีสารเคลือบผิวชั้นนอกสุด (Cuticle) เป็นด่านแรกในการป้องกันทั้งทางกายภาพและเคมีในการเกาะติดของเชื้อโรค แต่เมื่อเปลือกได้รับอันตรายเกิดบาดแผลหรือเกิดการบุกรุกของเชื้อโรคเข้าไปในร่างกาย โดยผ่านทางอื่น เช่น เหงือก ทางเดินอาหาร ก็จะมีเชื้อโรคเข้าไปในร่างกายได้และจะเป็นผลทำให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ Innate immune system ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกันของ Cellular และ Humoral immunity ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean จะอาศัยเซลล์เม็ดเลือด

(Haemocytes) ที่ไหลเวียนในร่างกายเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม ทั้งที่เป็นส่วนของเซลล์ (Cellular defense) และสารน้ำ (Humoral defense) (Johansson *et al.*, 2000) ซึ่งการตอบสนองโดยเซลล์จะประกอบด้วยกระบวนการ Phagocytosis, Nodule formation และ Encapsulation ซึ่งโดยทั่วไปเป็นผลมาจากการทำงานร่วมกันของเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิด ซึ่งได้แก่ Hyalinocytes, Semi-granulocytes และ Granulocytes (Brakk *et al.*, 1996) และนอกเหนือจากหน้าที่เหล่านี้แล้วเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิดยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับ Humoral defense ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญสามประการคือ ProPO activating system, ระบบการแข็งตัวของเลือด (Clotting system) และการสร้างสารในกลุ่ม AMPs (Sritunyalucksana and Soderhall, 2000; Destoumieux *et al.*, 2001; Haug *et al.*, 2002)

Cellular immunity ในสัตว์กลุ่ม Crustacean นั้น โดยทั่วไปเป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดเป็นหลัก ซึ่งแต่ละชนิดมีหน้าที่ในการตอบสนองและป้องกันสิ่งแปลกปลอมแตกต่างกัน ผลของการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในแต่ละชนิดทำให้เกิดขบวนการ Phagocytosis, Encapsulation และ Nodule formation รวมทั้งการหลั่งสารเพื่อทำให้เกิด Cytotoxic reaction กระบวนการ Phagocytosis จากการศึกษาของ Campa-Cordova *et al.* (2002) ได้ศึกษาการแสดงออกของ Superoxide anion (O_2^-) และ Superoxide dismutase (SOD) activity ในเม็ดเลือดและกล้ามเนื้อของกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* โดยการแช่ด้วยเบต้า-กลูแคน และ Sulphated polysaccharide เป็นเวลา 1, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าเบต้า-กลูแคน และ Sulphated polysaccharide สามารถเพิ่ม O_2^- และ SOD activity เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากแช่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณ Total Haemocyte Count (THC) ลดลงภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากแช่ แต่ THC และ Total Soluble Haemocyte Protein เพิ่มขึ้นกว่าปรกติภายหลังจากแช่เบต้า-กลูแคน และ Sulphated polysaccharide 48 - 120 ชั่วโมง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกระบวนการ Phagocytosis จะเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมขนาดเล็กโดยเซลล์เม็ดเลือดชนิด Hyalinocytes ขณะที่ Encapsulation และ Nodule formation เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนกว่า มักเกิดกับสิ่งแปลกปลอมที่มีจำนวนมากหรือขนาดใหญ่มากเกินไปเกินกว่า Hyalinocyte จะทำงานได้ เช่น เชื้อรา, Nematodes, ไข่ปรสิต หรือตัวอ่อน (Holmblad and Soderhall, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Smith and Ratcliffe (1980) ได้ศึกษากลไกการป้องกันตัวโดยอาศัยเซลล์ใน Shore crab (*Carcinus maenas*) โดยการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* และ *Moraxella sp.* โดยการตรวจสอบทางพยาธิสภาพและ ultrastructural ของเหงือก หัวใจ ตับและตับอ่อน พบว่าส่วนหลักไปอยู่ที่เหงือก ต่อมาพบที่หัวใจ ตับและตับอ่อน ซึ่งแบคทีเรียที่พบที่เหงือกรูปร่างเป็นเซลล์เล็ก ๆ มากมายประกอบด้วย Refractile และ Phagocytic

cells เป็นกลุ่มมีปริมาณสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง หลังจากการฉีดและอยู่ได้ถึง 7 วัน การรวมกลุ่มนี้เป็นการจดจำแบบที่เร็วและสิ่งแปลกปลอมทำให้เม็ดเลือดมาเกาะติด ดังนั้นจึงยับยั้งการแพร่กระจายของการติดเชื้อได้

ขณะที่การตอบสนอง Humoral immunity นั้นเป็นระบบการตอบสนองที่เกิดจากปฏิกิริยาหลายอย่าง โดยการทำงานร่วมกันของสารหลายชนิด เช่น Proteolytic cascade enzymes ทำให้เกิด Clotting system, Melanin formation, Opsonization และการสังเคราะห์โปรตีนในกลุ่ม AMP โดยการเกิดกระบวนการ Clotting system นั้นเป็นกระบวนการที่สำคัญทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นจะมี Clottable protein ในพลาสมาทำหน้าที่ให้เกิดการแข็งตัวของเลือด โดยการกระตุ้นของเอนไซม์ TGase ใน Crayfish น้ำเลือดจะแข็งตัวโดยการจับกันของเอนไซม์ TGase ที่ถูกกระตุ้นกับ Clotting protein ในน้ำเลือด โดยพบว่าเม็ดเลือดของ Crayfish จะมีการสร้างเอนไซม์ TGase เช่นเดียวกับในเนื้อเยื่อชนิดอื่นหลายชนิด ขณะที่ตับและตับอ่อน และ Plasma ไม่พบ TGase (Wang *et al.*, 2001) ในกึ่งการแข็งตัวของเลือดเริ่มโดยการกระตุ้นและหลั่งสารของ Hyalinocytes (Deposit cells) ซึ่งมีองค์ประกอบที่หลั่งออกมาจากเม็ดเลือดทำปฏิกิริยากับ Plasma factor โดยเชื่อว่าเป็น TGase ส่วน Plasma factor คือ Clottable protein

ProPO-activating system จัดเป็นระบบการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ที่ประกอบด้วยกลุ่ม Proteinase ซึ่งได้แก่ PRPs เช่น β -1,3-glucan binding protein (β GBP), Lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) เป็นต้น Zymogenic proteins และ ProPO (Soderhall and Cerenius, 1998) เมื่อมีการกระตุ้นด้วยจุลชีพ จะเกิด Complex ระหว่างโครงสร้างที่เป็นผนังเซลล์ของจุลชีพ กับ โมเลกุลของ PRPs และจะถูกจับโดยที่รับ (Receptor) บนผิวของเซลล์เม็ดเลือดบางชนิด เป็นผลให้เกิดขบวนการ Degranulation ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวก Proenzyme และ Substrates ของกระบวนการ ProPO เกิดขึ้น ซึ่งรูปที่ Active ของ ProPO คือ Phenoloxidase (PO) โดย ProPO ซึ่งเป็นรูป Inactive จะถูกสร้างขึ้น แล้วจะถูกกระตุ้นด้วย Serine proteinase (SP) ซึ่งเรียกว่า ProPO-activating factor/enzyme (ppA) (Soderhall and Cerenius, 1998) PO ที่ถูกสร้างขึ้นจะกระตุ้นปฏิกิริยา Oxidation ของ Phenols ให้เปลี่ยนเป็น Quinones ซึ่งจะนำไปสู่ขบวนการเกิด Melanin (Melanin formation or Melanization) โดยจะเป็นส่วนป้องกันไม่ให้เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายของกุ้งในที่สุด อย่างการศึกษาของ Soderhall *et al.* (1979) ได้ศึกษาใน Crayfish พบว่า PO มีอยู่ใน

เม็ดเลือด โดยในน้ำเลือดจะมี Enzyme activity อยู่บ้าง ซึ่งจะเป็นตัวจับกับผนังเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยอาศัยโปรตีนเป็นสื่อกลาง เช่น ทริปซิน โดยบางส่วนของเบต้า-กลูแคน และ Laminaran สามารถป้องกันการเกาะติดของผนังเซลล์ของเชื้อราได้ โดยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ PO activity จะทำหน้าที่จับกับผนังเซลล์ของเชื้อ *Aphanomyces astaci* ได้ดีเท่ากับ *S. cerevisiae* รวมถึงการศึกษาของ Vargas-Albores *et al.* (1996) ได้ศึกษา Plasma protein ที่แยกมาจาก Brown shrimp (*P. californiensis*) พบว่า β GBP สามารถถูกชักนำให้กระตุ้นระบบ ProPO ด้วย laminarin ได้เช่นกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Perazzolo and Barracco (1997) ที่ศึกษาระบบ ProPO activating ของกุ้ง *P. paulensis* ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยมากกว่า 90% พบในเม็ดเลือด โดยมี enzyme activity จากองค์ประกอบผนังเซลล์ของจุลชีพเช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน ซึ่งเกี่ยวข้องกับการจดจำแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดย PO activity จะพบในน้ำเลือดและ trypsin ส่วน ไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถเพิ่ม Enzyme activity โดยการตอบสนองดังกล่าวชักนำให้เกิด Cell-adhesion และ Degranulation ของเม็ดเลือดได้

นอกจาก ProPO-activating system แล้ว ระบบการแข็งตัวของเลือด และการสร้าง AMPs ก็เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่เป็นผลมาจากการเกิด Degranulation ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้ง ระบบการแข็งตัวของเลือดจัดเป็นกลไกการตอบสนองของกุ้งเพื่อดักจับสิ่งแปลกปลอมและการสูญเสีย Haemolymph ออกไปทางบาดแผล โดยอาศัยการเกิด Polymerization ของ Clotting protein ในพลาสมา ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} และเอนไซม์ TGase ซึ่งปลดปล่อยมาจากเซลล์เม็ดเลือด เช่นกัน ขณะที่ AMPs ที่ปลดปล่อยออกมาจะมีผลในการต่อต้านเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างไม่จำเพาะเจาะจงและสามารถพบได้ในสัตว์หลายชนิด โปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ 6.5 kDa peptide (Schnapp *et al.*, 1996), Callinectin (Khoo *et al.*, 1999), Crustin (Cuthbertson *et al.*, 2002) และ Penaeidin (Destoumieux *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ยังสามารถสร้าง Serine Proteinase Inhibitors (SPIs) อย่างเช่น Pacifastin และ α_2 -macroglobulin (α_2M) เพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งหน้าที่ของเอนไซม์ Proteinase ของเชื้อโรคและยังทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้าง Proteinase ในระบบ ProPO-activating system อีกด้วย (Aspan *et al.*, 1990; Dieguez-uribeondo and Cerenius, 1998)

4. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants)

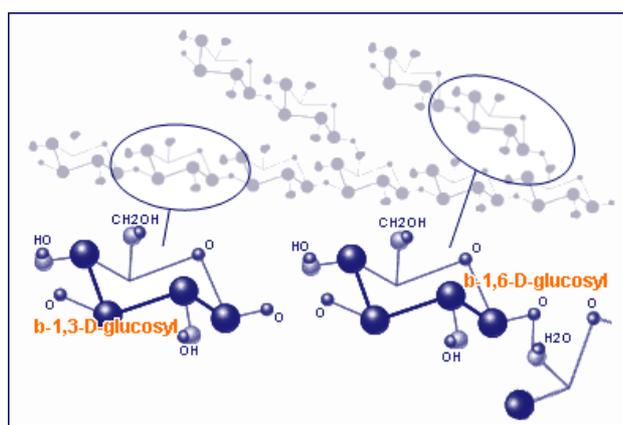
สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จัดเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์หรือ ส่วนประกอบบนโครงสร้างของจุลชีพ พืชและสาหร่ายบางชนิดรวมถึงสารที่เกิดจากการสังเคราะห์ทางเคมีอื่น ๆ ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นให้สัตว์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันให้สัตว์สามารถต้านทานต่อเชื้อจุลชีพหรือเชื้อโรคต่าง ๆ ได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยมีการศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิด รวมถึงสัตว์ชนิดอื่น ๆ โดยชนิดของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันและแหล่งที่มาส่วนใหญ่มาจากทั้งในพืช และสัตว์ รวมทั้งสารประกอบจากโครงสร้างของจุลินทรีย์ โพลีแซคาไรด์ หรือสารสังเคราะห์อื่น ๆ (ตารางที่ 1)

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะได้อาจมาจากโครงสร้างผนังเซลล์ของจุลชีพ ได้แก่ เปปติโดไกลัยแคนจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ไลโปโพลีแซคคาไรด์จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ และเบต้า-กลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์และเชื้อรา การศึกษาครั้งนี้จะใช้เบต้า-กลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการศึกษาเบต้า-กลูแคนครั้งแรกเริ่มขึ้นในทศวรรษที่ 40 เมื่อ Pillemer and Ecker (1940) ได้ทำการศึกษา Zymosan ซึ่งเตรียมได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ หลังจากนั้นราวทศวรรษที่ 50 Riggi and Di Luzio (1961) ได้ทำการวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าสารที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน Zymosan คือ เบต้า-กลูแคนซึ่งเป็นโพลีแซคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วย Glycoside linkage ตรงโมเลกุลของออกซิเจนที่ตำแหน่ง C1 กับ Hydroxyl ที่ตำแหน่ง C3 ของอีกกลุ่มหนึ่ง (ภาพที่ 1) โครงสร้างที่สำคัญของเบต้า-กลูแคนซึ่งมีลักษณะเฉพาะคือ เป็นโพลีแซคาไรด์สายยาวของน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะ β -1,3 เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวทำหน้าที่เป็นแกนกลางและจะแตกแขนงออกด้วยสายเชื่อมของโมเลกุลกลูโคส ซึ่งต่อกับเบต้า-กลูแคนสายหลักด้วยพันธะ β -1,6 ซึ่งจะมีขนาดสั้นยาวแตกต่างกันออกไป โดยสามารถเชื่อมต่อกันระหว่างสายด้วยกันเองโดยพันธะไฮโดรเจน ในปัจจุบันแหล่งที่ใช้ในการผลิตเบต้า-กลูแคนนั้นสามารถพบได้ในหลาย ๆ แหล่ง เช่น จากเชื้อรา พืชน้ำพอกสาหร่ายแบคทีเรียบางชนิด รวมทั้งจากยีสต์อีกด้วย

ตารางที่ 1 กลุ่ม แหล่งที่มา และชนิดของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ

กลุ่มสาร	ชนิดของสาร
Biological substances	Animal and plant extracts: EF-203(chicken), Ete (Tunicate), Hde (Abalone), Firefly squid (soap tree), Glycyrrhizin (Licorice), Laminaran (Seaweed)
	Bacteria derivatives: Peptidoglycan, B-glucan (MacroGard, VitaStim, SSG, Eco-Activa, Betafectin), FCA, EF-203, Lipopolysaccharide (LPS), Clostridium butyricum cell, Achromobacter stenohalis cells, Vibrio anguillarum cell
	Hormones, cytokines and others: Growth hormone, Interferon, Interlukin-2, Lactoferrin, Nucleotides, Prolactin, TNF Nutritional factors: Vitamin C, E, A, Nucleotides, Trace elements (Zinc, Iron, Copper, Selenium), Protein, Carbohydrate
	Polysaccharide: Chitin, Chitosan, Lentinian, Oligosaccharide, Sclerotium, Schizophyllan
Synthetic chemicals	Avridine, Bestatin, DW-2929, FK-156, FK-565, Fluoro-quindone, Freund's adjuvant, Isoprinosine, Levamisole, Muramyl dipeptide (MDP)

ที่มา: Galindo-Villegas and Hosokawa (2004)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเบต้า-กลูแคน

ที่มา: http://www.immunocorp.com/beta-glucan/bio_research.cfm

ในปัจจุบันนั้นเริ่มมีการศึกษาวิจัย โดยนำเอาคุณสมบัติในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของ เบต้า-กลูแคนมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในส่วนของ การเพาะเลี้ยงสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไป เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า เมื่อควบคุมให้สัตว์ทดลองได้รับเบต้า-กลูแคนในรูปแบบต่าง ๆ จะทำให้สามารถ ป้องกันการเกิดเนื้องอก (Tumour) ในสัตว์ทดลองได้เป็นอย่างดี และยังพบว่าสามารถป้องกันให้ สัตว์ทดลองต้านทานการติดเชื้อซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อโรค ไม่ว่าจะเป็น โปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส (Brown and Gordon, 2005) ด้วยเหตุผลดังกล่าว จึงเริ่มมีแนวความคิดและนำประโยชน์ ดังกล่าวมาทำการทดลองในสัตว์น้ำเช่นกัน

Sveinbjornsson and Seljelid (1994) ได้ศึกษาในปลา Salmon pronephros โดยการกระตุ้น แมคโครฟาจด้วย β -1,3-D-polyglucose โดยวัดผลจากการผลิต O_2^- , Pinocytotic activity, Acid phosphatase activity และ Morphological criteria จากการกระตุ้นแสดงให้เห็นว่าการผลิต O_2^- มีการ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยวัดจากการลดลงของ Nitroblue tetrazoleum และการ เพิ่มขึ้นของระดับ Acid phosphatase activity ดังนั้นการกระตุ้นดังกล่าวสามารถเพิ่ม Pinocytotic activity ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและการกระจายตัวของเซลล์ด้วย

Song *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาการแช่และการผสมเบต้า-กลูแคนในอาหารให้กุ้งกุลาดำ กิน พบว่าภายหลังการทดสอบความคุ้มโรคด้วยเชื้อ *V. vulnificus* และ WSSV กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลู แคนทั้งสองวิธีสามารถต้านทานเชื้อโรคทั้งสองชนิดได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังทำให้กุ้งสามารถทนต่อสภาพความเครียดอันเกิดจากการจับ การขนส่ง และน้ำที่มี แอมโมเนียในปริมาณสูงได้อีกด้วย

Chang *et al.* (2000) ได้รายงานว่าการใช้เบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ *Schizophyllum commune* ผสมอาหารในอัตรา 2 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมสามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมี ขบวนการเกิด Phagocytosis, การสร้าง O_2^- และการเกิด Cell adhesion ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมี นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.001$) และยังพบว่า การเสริมเบต้า-กลูแคนสามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการ ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันสูงสุดที่ 24 วันภายหลังการเริ่มให้อาหาร Chang *et al.* (2003) ได้ ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ *S. commune* ในอาหารต่อการ ต้านทานเชื้อไวรัสจุดขาว พบว่าการใช้เบต้า-กลูแคน 10 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมให้กุ้งกินเป็นเวลา 20 วัน สามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำสามารถต้านทานต่อเชื้อ WSSV ได้ดีกว่า ระดับ 0, 1, 2 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่า การเสริมเบต้า-กลูแคน

ในอาหารในระดับ 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นกระบวนการ Phagocytosis, PO, THC, ปริมาณ O_2^- และ SOD ได้ดีกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

Suphantharika *et al.* (2003) พบว่าการใช้เบต้า-กลูแคนจาก Spent brewer's yeast สามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดของกึ่งกุลาคามีการเกิด PO activity ในหลอดทดลอง ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยเบต้า-กลูแคนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังพบว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหาร 0.2% (W/W) ให้กึ่งกินติดต่อกันเป็นเวลาสามวันสามารถกระตุ้นให้กึ่งมีการเกิด PO activity ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

Selvaraj *et al.* (2006) ศึกษาผลของการใช้เบต้า-กลูแคนร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่ออัตราการรอด และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลาไน *Cyprinus carpio* เมื่อทดสอบการต้านทานเชื้อด้วย *Aeromonas hydrophila* โดยใช้เบต้า-กลูแคนจาก *S. cerevisiae* และ ไลโปโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อ *A. hydrophila* ที่มีความรุนแรง โดยผสมกันที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 1, 7 และ 14 วัน โดยวิธีการต่าง ๆ (ฉีดเข้าช่องท้อง แช่ และ ผสมอาหาร) กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีดเข้าช่องท้องหาค่า LD_{50} ได้ในวันที่ 16 บั้นที่อัตราการตายและเปอร์เซ็นต์การตาย (RPS) พบว่ามีอัตราการตาย 100 % ในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 1% ผสม ไลโปโพลีแซคคาไรด์ 0.10% ขณะที่กลุ่มที่ได้รับโดยการผสมอาหารมีค่า RPS สูงขึ้นโดยใช้เบต้า-กลูแคน 1% ผสม ไลโปโพลีแซคคาไรด์ 0.25% ส่วนวิธีการแช่ไม่สามารถเพิ่มค่า RPS ได้ นอกจากนี้กลุ่มที่ฉีดเข้าช่องท้องสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดรวมโดยเฉพาะในส่วนของ Neutrophils, Monocytes และ O_2^- ก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นซึ่งสามารถสันนิษฐานได้ว่าจะมีความสามารถในการฆ่าและทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ รวมถึงมีผลไปกระตุ้นแอนติบอดีให้สูงขึ้นเพื่อต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* และเมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR ไม่พบว่ามี การแสดงออกของ Interleukin-1B mRNA ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นการเสริมเบต้า-กลูแคนร่วมกับไลโปโพลีแซคคาไรด์สามารถต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและจำเพาะเจาะจง

Kumari and Sahoo (2006) ได้ศึกษาการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาคูค *Clarias batrachus* โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.1% เป็นเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ โดยวัด Superoxide production, serum myeloperoxidase (MPO) content, Natural haemagglutinin level, Complement และ

Lysozyme activities นอกจากนี้ยังวัดค่า Specific growth rate (% การเพิ่มน้ำหนักตัวต่อวัน) และทดสอบการต้านทานเชื้อ *A. hydrophila* ผลการทดลองพบว่า การเสริมเบต้า-กลูแคน 0.1% เป็นเวลา 1 สัปดาห์สามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและสามารถต้านทานโรคได้

Bao *et al.* (2007) ศึกษาการแสดงออกของ ProPO-activating serine protease (PAP) ใน Wild silkworm (*Samia cynthia ricini*) พบว่าแทบจะไม่มีการแสดงออกในไข่ม้วนของตัวอ่อน แต่สามารถชักนำให้มีมากขึ้นเมื่อนิโคตินเบต้า-กลูแคน หรือเซลล์แบคทีเรีย

Ai *et al.* (2007) ศึกษาผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 0%, 0.09% และ 0.18% ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน แบบไม่จำเพาะเจาะจงและการต้านการติดเชื้อ *V. harveyi* ในปลา Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนปริมาณ 0.09% สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต ในขณะที่ 0.18% ไม่สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตได้ พบ Lysozyme activity มีค่าเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.18% มากกว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.09% อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างของ Alternative Complement Pathway (ACP) activity ระหว่างกลุ่มที่เสริมเบต้า-กลูแคนและไม่ได้เสริมเบต้า-กลูแคน ค่า Phagocytosis Percentage (PP) และ Respiratory burst activity ในปลาที่เสริมเบต้า-กลูแคน 0.09% สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่มีค่าลดลงเมื่อเสริมในปริมาณที่ 0.18% และไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมเบต้า-กลูแคน ทดสอบการต้านเชื้อกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.09% มีอัตราการตายสะสมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.18% อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน 0.18% ดังนั้นการได้รับเบต้า-กลูแคนในปริมาณต่ำ (0.09%) สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในเวลา 8 สัปดาห์ด้วยวิธีการผสมอาหาร

นอกจากนี้ยังมีสารในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์และสารสกัดจากสาหร่ายที่นำมาศึกษาความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ได้แก่ การศึกษาของ Wang and Chen (2005) โดยศึกษาการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว *L. vannamei* ที่ฉีดด้วยไคติน ปริมาณ 4, 6 และ 8 mg/g หรือไคโตซาน 2, 4 และ 6 mg/g แล้วทดสอบการต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* ที่ความเข้มข้น 2×10^6 CFU พบว่ากุ้งที่ได้รับไคตินไคโตซานภายหลังจาก 1 วัน สามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันสูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนค่า THC, PO activity, Respiratory burst, SOD

activity และ Phagocytic activity ต่อการต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* พบว่ามีค่า THC และ Respiratory burst เพิ่มขึ้นภายหลังจาก 2 ชั่วโมง และมีระดับ PO activity สูงเป็นเวลา 6 วัน ค่า Phagocytic activity ต่อการต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* เพิ่มขึ้นหลังจาก 1 วัน ดังนั้นกุ้งที่รับไคติน 6 mg/g หรือ ไคโตซาน 4 mg/g หรือน้อยกว่าสามารถเพิ่มความสามารถทางภูมิคุ้มกันและต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* ได้

Liu *et al.* (2006) ศึกษาการเสริม Sodium alginate ในอาหารปริมาณ 0, 1.0 และ 2.0 g/kg ให้กุ้งกุลาดำกินเป็นเวลา 5 เดือน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม Sodium alginate ปริมาณ 1.0 และ 2.0 g/kg มีค่า SOD activity เพิ่มสูงขึ้นแต่ค่า Respiratory bursts ลดลง การแสดงออกของยีน β -1,3-Glucan-Binding Protein (β GBP), Peroxinectin, Cytosolic -SOD, penaeidin -5 และ Single Whey Domain Protein (SWDP) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม Sodium alginate 2.0 g/kg เป็นเวลา 5 เดือน อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม Sodium alginate ดังนั้นการให้อาหารเสริม Sodium alginate สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันได้ เช่นเดียวกับ Cheng *et al.* (2004) ที่ศึกษาผลของการฉีด Sodium alginate ในปริมาณ 10, 20 และ 50 mg/g ในกุ้งขาว *L. vannamei* พบว่าไม่มีความแตกต่างของ THC, Differential Haemocyte Count (DHC), SOD activity ระหว่างกุ้งที่ฉีด Sodium alginate แต่กุ้งที่ฉีด Sodium alginate ในปริมาณ 20 mg/g สามารถเพิ่ม PO activity และ Respiratory burst หลังจากฉีด Sodium alginate ป้อนเวลา 2 และ 1 วันตามลำดับ ส่วนในกลุ่มที่ฉีด Sodium alginate 50 mg/g มีค่า Phagocytic activity และ Clearance efficiency ต่อเชื้อ *V. alginolyticus* หลังจาก 4 วันสูงกว่า ในการทดลองฉีด Sodium alginate ต่อการต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* ที่ความเข้มข้น 2×10^7 CFU/ตัว พบว่ามีอัตราการรอดตายสูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุม (6 วันหลังจากฉีดเชื้อ) ดังนั้นกุ้งที่ได้รับ Sodium alginate 10 mg/g หรือมากกว่าสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันและการต้านทานต่อเชื้อ *V. alginolyticus* ได้

Huang *et al.* (2007) ศึกษาการใช้ *Sargassum fusiforme* สกัดเป็น โพลีแซคคาไรด์ (SPFSE) ผสมในอาหาร (0%, 0.5%, 1.0% และ 2.0%) เป็นเวลา 14 วัน ในกุ้ง *Fenneropenaeus chinensis* ระยะ Juvenile ต่อการต้านทานเชื้อ *Vibriosis* พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารผสม 1.0% และ 0.5% SPFSE มีอัตราการตายสะสมภายหลังจากการฉีดเชื้อเป็นเวลา 24 และ 30 ชั่วโมง ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนที่ 2.0% SPFSE พบว่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่มี ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม 1.0% และ 0.5% SPFSE ส่วนค่า THCs มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอาหารผสม SPFSE ส่วนความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือด และ PO activity และ Muscular lysozyme activity เพิ่มขึ้นและลดลง

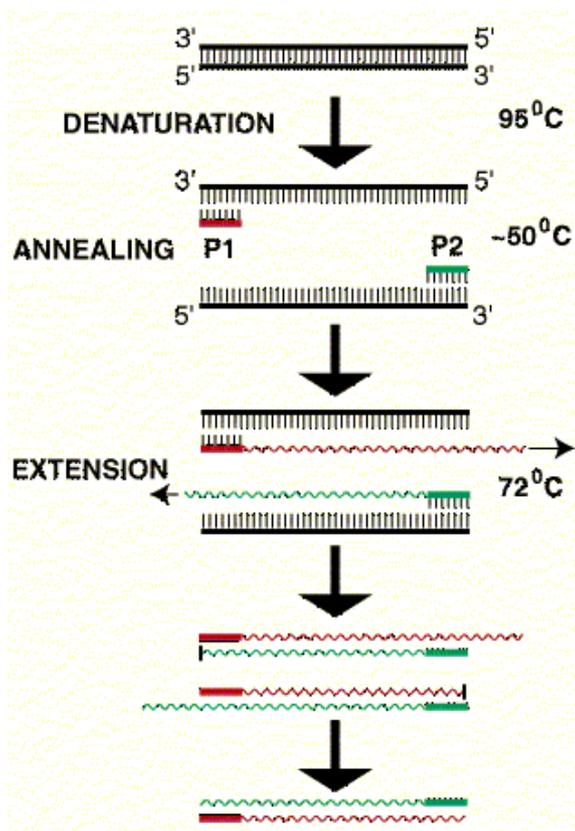
เมื่อได้รับ SFPSE เพิ่ม โดยความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือดสูงสุดเป็น 167.46 mg/ml ในกลุ่ม 1.0% SFPSE PO activity และ Muscular lysozyme activity สูงสุดเป็น 13.20 U และ 3.21 U mg/prot ในกลุ่ม 0.5% SFPSE ตามลำดับ ดังนั้นการเสริม SFPSE ในอาหารระดับ 0.5% และ 1.0% เป็นเวลา 14 วัน มีประสิทธิภาพในการต้านทานเชื้อ *Vibriosis* และเพิ่มภูมิคุ้มกันได้และ Fu *et al.* (2007) ได้ศึกษาโดยใช้ *Gelidium amansii* ศึกษาค่า THC, PO activity และ Respiratory burst ในกึ่ง *L. vannamei* โดยการแช่ด้วย hot-water extract ของสาหร่ายสีแดง *G. amansii* ในปริมาณ 200, 400 และ 600 mg/l โดยการฉีดด้วย hot-water extract ปริมาณ 4 และ 6 mg/g และโดยการผสมอาหาร hot-water extract ปริมาณ 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg พบว่ากึ่งที่ทดลองโดยการแช่ hot-water extract ปริมาณ 400 และ 600 mg/l ภายหลัง 1 ชั่วโมง กึ่งที่ได้รับการฉีดด้วย hot-water extract ปริมาณ 6 mg/g ภายหลังจาก 1 วัน และกึ่งที่ได้รับอาหารผสม hot-water extract ปริมาณ 1.0 and 2.0 g/kg 14 วัน พบว่ามีค่า THC, PO activity และ Respiratory burst เพิ่มขึ้น ค่า Phagocytic activity และ Clearance efficiency ของกึ่งที่ได้รับอาหารผสม hot-water extract ปริมาณ 1.0 และ 2.0 g/kg สูงกว่า กึ่งที่ได้รับอาหารผสม hot-water extract ปริมาณ 0 และ 0.5 g/kg หลังจาก 14 และ 28 วัน ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการต้านทานเชื้อของกึ่งที่ให้ hot-water extract โดยการฉีดและผสมอาหารต่อเชื้อ *V. alginolyticus* ภายหลังจากการฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมง หรือ 28 วัน ที่ความเข้มข้น 2×10^6 และ 1×10^6 CFU อัตราการรอดตายของกึ่งที่ฉีดด้วย hot-water extract ปริมาณ 6 mg/g สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่าง มีนัยสำคัญหลังจากฉีดเชื้อ 1 วัน และกึ่งที่ได้รับอาหารผสม hot-water extract ปริมาณ 0.5, 1.0 และ 2.0 g/kg อัตราการรอดตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากฉีดเชื้อ 3 วันจนครบ 6 วัน จึงสามารถสรุปได้ว่ากึ่งขาวที่แช่ด้วย hot-water extract ปริมาณ 400 mg/l กึ่งที่ฉีดด้วย hot-water extract ปริมาณ 6 mg/g และกึ่งที่กินอาหารผสม hot-water extract 2.0 g/kg หรือน้อยกว่านั้นสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ *V. alginolyticus*

5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาที่อาศัยหลักการของการเกิด DNA replication ในหลอดทดลอง (*In vitro*) แบบซ้ำ ๆ กันหลายรอบ (Replicated cycles) ดังแสดงในภาพที่ 2 ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โมเลกุลต้นแบบ (Template molecule) ซึ่งอาจเป็น DNA หรือ RNA ที่ต้องการเพิ่มปริมาณ สายนิวคลีโอไทด์เส้นเดี่ยวสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสจำเพาะคู่สมกับ Template (Primer molecules) เพื่อเป็นตัวเริ่มต้นของการเพิ่มปริมาณ Template DNA โดยมีปฏิกิริยาที่สำคัญแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่

1. Denaturation ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ทำให้ DNA เสียสภาพ โดยทำให้ DNA แม่พิมพ์ (Template) สายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว เกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Primer annealing ขั้นตอนนี้ Primers (P) 2 สาย ดังภาพที่ 2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์สมมูลกับ DNA แม่พิมพ์ เข้าไปจับ DNA แม่พิมพ์แต่ละสายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์สมมูลกับ DNA สายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ที่ปลาย 3' เกิดที่อุณหภูมิประมาณ 40 - 60 องศาเซลเซียส
3. Primer extension ขั้นตอนนี้เป็นการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของ primer โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase บริเวณ Klenow fragment ซึ่งต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 70-75 องศาเซลเซียส

เมื่อปฏิกิริยาเกิดซ้ำ ๆ กันจำนวนหลายรอบ จะทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากเดิมได้อย่างทวีคูณ (Exponential) โดยมีจำนวนผลผลิต (PCR product) จำนวนได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100%



ภาพที่ 2 ปฏิกริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ที่มา: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/PCR.gif>

RT-PCR เป็นวิธีที่ถูกดัดแปลงมาจากการทำปฏิกริยา PCR ธรรมดา โดยมีหลักการที่สำคัญคือต้องเปลี่ยน RNA ต้นแบบให้กลายเป็น Complementary DNA (cDNA) เสียก่อน โดยอาศัยกระบวนการ Reverse transcription หลังจากนั้น cDNA ที่ได้ทำหน้าที่เป็นแม่แบบ (Template) ในปฏิกริยา PCR ธรรมดา เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงมาก จึงนิยมนำไปประยุกต์ใช้ในการใช้ตรวจสอบปริมาณ RNA ของ ตัวอย่างที่มีจำนวนจำกัด เช่น ใช้ในการตรวจวินิจฉัยการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA รวมทั้งการตรวจวัดระดับปริมาณ mRNA ในกระบวนการ Transcription ของการแสดงออกของยีนชนิดใดชนิดหนึ่งในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ในสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจ (Carding *et al.*, 1992) โดยเทคนิคนี้จะทำการวัด End point ของการเพิ่มจำนวน PCR product โดยใช้จำนวนรอบน้อยกว่าการทำ PCR ปรกติ โดยจะใช้จำนวนรอบประมาณ 20-25 รอบ หลังจากนั้นจะทำการตรวจประเมินการแสดงออกของยีนที่เราสนใจด้วยกระบวนการ Gel electrophoresis โดยความหนาหรือความเข้มของ PCR product จะแปรผันตรงกับปริมาณ cDNA template เริ่มต้น จึงเรียกเทคนิคนี้อีกอย่างว่าเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

หรือ conventional RT-PCR ในการศึกษานอกจากจะทำการตรวจสอบระดับของยีนที่เราสนใจแล้ว ยังต้องทำการตรวจสอบยีนที่เรียกว่า Housekeeping gene เช่น β -actin หรือ Elongation factor ซึ่งจะใช้เป็นยีนเปรียบเทียบหรือยีนควบคุมเสมอ การแสดงออกของ Housekeeping gene นั้น จะเป็นเครื่องยืนยันถึงสภาพการทำงานของเซลล์ที่มีชีวิต ไม่ว่าจะอยู่ในสภาพใดก็ตาม (Marone *et al.*, 2001) ดังนั้นจึงสามารถอธิบายได้ว่าเทคนิค RT-PCR นั้น เป็นเทคนิคที่ใช้ RNA เป็น Template ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ Gene transcription ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งโดยปกติสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามการตอบสนองต่อสัญญาณที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้ามากมาย ทั้งในขณะมีการพัฒนา การเปลี่ยนแปลง และขณะเซลล์ทำหน้าที่ในทางสรีรวิทยา ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงระดับของ mRNAs ขั้นตอนสำคัญของเทคนิค RT-PCR เริ่มต้นโดยการสกัด Total RNA หรือ mRNA จากเนื้อเยื่อหรือเซลล์ แล้วใช้ RNA ที่ได้เป็น Template สำหรับปฏิกิริยา Reverse transcription ให้สังเคราะห์ cDNA จากนั้น cDNA ที่สังเคราะห์ได้จะเป็น Template สำหรับปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Primer 2 สาย ที่สังเคราะห์มาเพื่อขยายตำแหน่งที่สนใจบน cDNA นั้น PCR product ที่ได้สามารถตรวจสอบขนาดด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis และตรวจยืนยันโดยวิธี Restriction digestion, Hybridization หรือ Nucleotide sequencing สำหรับการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA มีวิธีการที่นิยมทำอยู่ 3 วิธี ได้แก่

1. เริ่มต้นการสังเคราะห์โดย 3' (Antisense) Gene-specific primer เข้าไปจับคู่สม (Anneal) กับ mRNA แล้วต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (Extend) ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase โดยใช้ mRNA เป็นแม่แบบสังเคราะห์ให้ได้ cDNA ซึ่งเป็นแม่พิมพ์สำหรับ 5' (Sense) Primer สังเคราะห์ได้ DNA สายใหม่ที่เป็นคู่สมกับ cDNA ซึ่งจะถือเป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยา PCR ต่อไป

2. เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยใช้ Oligo dT เป็น Primer ไปจับกับส่วน Poly A tail ที่ปลาย 3' ของ mRNA ทุก ๆ โมเลกุล จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase ต่อไป จึงใช้ Gene-specific PCR primers ในการเพิ่มขยายด้วยปฏิกิริยา PCR กับส่วนของ cDNA ที่จำเพาะตามต้องการ ซึ่งเป็นวิธีที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้

3. เริ่มต้นการสังเคราะห์โดยใช้ Random hexamers ไปจับกับหลาย ๆ ตำแหน่งบน mRNA อย่างสุ่ม จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse transcriptase ตามด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Gene-specific primers เพิ่มขยายส่วนของ cDNA ที่ต้องการต่อไป (วัชร และ มนตรี, 2536)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กุ้งกุลาดำ ขนาด 12-14 กรัม จำนวน 500 ตัว
2. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1 ตัน จำนวน 12 ถัง
3. สายอากาศ และหัวทราย
4. สวิง ผ่าสะอาด
5. น้ำเค็ม 25 ppt
6. β -1,3/1,6-กลูแคน (Biotec ASA, Norway)
7. อาหารกุ้งเบอร์ 3
8. น้ำมันปลาหมึก
9. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
10. เข็มฉีดยาขนาด 24 G และ กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
11. Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร, tube, Tip

ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

12. Autopipette ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
13. ตู้กระจก ขนาด 70 ลิตร จำนวน 24 ตู้
14. ถุงมือปลอดเชื้อ
15. เครื่องมือที่จำเป็นอื่น ๆ
 - Autoclave และ Hot-air oven
 - Homogenizer
 - Refrigerated centrifuge (Mikro 200R Hettich Zentrifugen)
 - เครื่อง PCR (Takara PCR Thermal Cycle)
 - Gel documentation (Syngene)

สารเคมี

1. 10% Sodium citrate
2. Trizol reagent (Life science, USA)
3. Chloroform
4. Isopropyl alcohol
5. 75% และ 95% Ethanol
6. RNase-free water
7. Diethylpyrocarbonate (DEPC)
8. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป StrataScript™ First-Strand cDNA Synthesis System
(Stratagene, USA)
9. ชุดน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่ DNA polymerase chain reaction
10. 1.5% Agarose
11. TBE buffer, PBS buffer
12. 100 bp DNA Ladder, Loading dye
13. Ethidium bromine (EtBr)
14. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Trypticase Soy Agar (TSA), Trypticase Soy Broth (TSB)
และ Thiosulfate Citrate Bile-Salt Sucrose Agar (TCBS)

วิธีการ

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งกูดาค่า

นำกิ้งกูดาค่าขนาด 12 - 14 กรัม ที่ไม่เคยได้รับการสารเบต้า-กลูแคน มาเก็บเลือดและเก็บอวัยวะที่ต้องการศึกษาคือ หัวใจ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย เหงือก และเนื้อเยื่อใต้เปลือก โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 การสกัด Total RNA จากเม็ดเลือดและอวัยวะอื่น ๆ

1.1.1 ทำการเก็บเลือดของกิ้งโดยใช้ Disposal syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 0.7 มิลลิลิตร ของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Sodium citrate) โดยใช้เข็มเจาะแฉ่งเลือดบริเวณ Ventral sinus ให้ได้ประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ผสมเลือดกิ้งและสารป้องกันการแข็งตัวให้เข้ากัน แล้วนำของเหลวที่ได้เทลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด

1.1.2 นำเลือดกิ้งที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายด้านบนทิ้งออกจนหมด ให้เหลือแต่ตะกอนเม็ดเลือดสีขาว เติม Trizol reagent (Life science, USA) ประมาณ 150 ไมโครลิตร บดตะกอนในหลอดบนน้ำแข็งจนละเอียด แล้วเติม Trizol reagent ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใช้เข็ม 24 G ในหลอดชนิดขนาด 3 มิลลิลิตร ดูดของเหลวขึ้นลงแรง ๆ เพื่อทำลาย Genomic DNA ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม Chloroform 0.2 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสไปใส่ใน Eppendorf tube หลอดใหม่ เติม Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร พลิกไปมาให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส เก็บตะกอนไว้ใน 75% Ethanol ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

1.1.3 ทำการเก็บอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งได้แก่ หัวใจ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย เหงือก และเนื้อเยื่อใต้เปลือก ลงในหลอดบดแก้วที่ล้างด้วย DEPC ที่อบไว้ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ยกเว้นในส่วนของลำไส้ให้ล้าง

ด้วยบัฟเฟอร์ PBS แล้วเติม Trizol reagent (Life science, USA) ประมาณ 150 ไมโครลิตร บด เนื้อเยื่อในหลอดบดน้ำแข็งจนละเอียด แล้วเติม Trizol reagent ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้าย ของเหลวที่ได้ลงใน Eppendorf tube หลังจากนั้นใช้เข็ม 24 G กับกระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร ดูดของเหลวขึ้นลงแรง ๆ ซ้ำกันประมาณ 10 ครั้ง เพื่อทำลาย Genomic DNA ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม Chloroform 0.2 มิลลิลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสไปใส่ใน Eppendorf tube หลอดใหม่ เติม Isopropyl alcohol 0.5 มิลลิลิตร พลิกไปมาให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสออก แล้วเก็บตะกอนไว้ใน 75% Ethanol ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

1.2 การสังเคราะห์ First-strand cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Reverse transcription

1.2.1 นำ Total RNA ที่เก็บใน 75% Ethanol มาเขย่าด้วย Vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ตกตะกอนให้แห้งพอ หมดประมาณ 5-10 นาที เติมน้ำกลั่น DEPC treated ประมาณ 12 ไมโครลิตร ทิ้งให้ละลายเข้ากัน แล้วนำมา 2 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น DEPC treated 68 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 260-280 nm เพื่อวัดความเข้มข้นของ RNA

1.2.2 นำ Total RNA จากข้อ 1.2.1 มา 3 ไมโครกรัม ปรับจนได้ปริมาตร 19 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น DEPC treated ทำการสังเคราะห์ First strand cDNA ตามวิธีการของบริษัท (Stratagene, USA) โดย เติม Oligo (dT) 1.5 ไมโครลิตร แล้วพลิก Eppendorf tube ไปมาให้เข้ากัน เบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที หลังจากนั้น เติม 10x First-strand buffer 2.5 ไมโครลิตร, RNase block Ribonuclease Inhibitor 0.5 ไมโครลิตร, 100 มิลลิโมล (mM) dNTPs 1 ไมโครลิตร, StrataScript Reverse Transcriptase 0.5 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน จะได้ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และ 90 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

1.3.1 นำ First-strand cDNA ที่สังเคราะห์ที่ได้จากข้อ 1.2 มาเป็น template เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ AMP, β GBP, Crustin, HSP70, Lysozyme, Penaeidin, Peroxinectin, ProPO, SPI และ TGase และใช้ β -actin เป็นยีนตรวจสอบเปรียบเทียบ (Internal control) โดยใช้ Specific primers ที่ออกแบบโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนซึ่งอ้างอิงถึง Accession number ที่บันทึกไว้ใน GenBank database ของแต่ละยีนในการทำ PCR (ตารางที่ 2) โดยใช้ปริมาตรและสภาพของปฏิกิริยาตามคำแนะนำของบริษัท (Takara, Japan) ดังนี้

1. cDNA Template	1.0	ไมโครลิตร
2. dNTPs Mix	2.0	ไมโครลิตร
3. 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
4. Forward primer	0.5	ไมโครลิตร
5. Reverse primer	0.5	ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่น DEPC treated	16.0	ไมโครลิตร

1.3.2 ทำการเติมสารเรียงตามลำดับในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 91 องศาเซลเซียส 5 นาที และ 54 องศาเซลเซียส 5 นาที ตามลำดับ

1.3.3 เตรียม Ex Tag 0.1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่น DEPC treated ให้ได้ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรลงไป หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ต่อไป โดยควบคุมสภาพของปฏิกิริยาดังนี้

Pre-denaturation	95	องศาเซลเซียส	1	นาที	} (25 รอบ)
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Annealing	55	องศาเซลเซียส	30	วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1	นาที	
	72	องศาเซลเซียส	10	นาที	

1.3.4 ภายหลังจากเสร็จสิ้นการทำปฏิกิริยาแล้ว ทำการเติม Loading dye 4.0 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำ PCR products ที่ได้ไปหยดบน Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 % และใช้ 100 bp DNA ladder marker 3.0 ไมโครลิตร เป็นแถบ DNA มาตรฐาน นำ Gel ที่ได้ไปผ่านกระแสไฟฟ้า โดยขบวนการ Electrophoresis ที่กำลังไฟ 100 Volt และกระแสไฟ 0.8 Ampere ประมาณ 40 นาที หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วย Ethidium bromide 20 นาที แล้วนำไปตรวจสอบแถบของ DNA ภายใตแสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation และทำการบันทึกภาพตามลำดับ แล้วทำการอ่านผลโดยพิจารณาจากความหนาแน่นของแบน PCR product และเปรียบเทียบขนาดของแบนที่พบในแต่ละอวัยวะ

2. ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำกุ้งกุลาดำขนาด 12.85 ± 0.69 กรัม/ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อทำการปรับสภาพกุ้งให้คุ้นเคยกับสภาพของห้องทดลองเป็นเวลา 7 วัน ระหว่างเลี้ยงให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป ประมาณ 5% ของน้ำหนักตัว 4 ครั้งต่อวัน หลังจากนั้น ทำการแยกกุ้งจำนวน 30 ตัว ไปเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร ที่บรรจุน้ำความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน 350 ลิตร จำนวน 12 ถัง เป็นเวลา 3 - 5 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 20% ทุก ๆ 2 วัน

2.2 การเตรียมอาหารสำหรับการทดลองและการให้อาหาร

2.2.1 นำสารสกัดเบต้า-กลูแคนไปชั่งน้ำหนักให้ได้ 1, 3 และ 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.2 นำสารละลายที่ได้ รวมทั้งน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ไปปั่นโดยใช้กระบอกฉีดลงบนอาหารเม็ดสำเร็จรูป 1 กิโลกรัม จะได้อาหารที่มีความเข้มข้นของเบต้า-กลูแคน 3 ระดับคือ 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ นำอาหารที่ได้ไปผึ่งลมให้แห้งแล้วเคลือบอาหารทดลองด้วยน้ำมันปลาหมึกก่อนให้ทุกครั้ง รวมทั้งอาหารที่ไม่มีเบต้า-กลูแคน (Control)

2.2.3 ทำการให้อาหารกุ้งทดลอง โดยจะแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ซ้ำ ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง วันละ 5% น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน

2.3 การประเมินผลของอาหารทดลองต่อการแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

2.3.1 การสกัด Total RNA

2.3.1.1 ทำการเก็บเลือดของกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่มที่ ก่อนการทดลอง และ ภายหลังกการให้อาหาร 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน โดยใช้ Disposal syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 0.7 มิลลิลิตร ของสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (10% Sodium citrate) โดยใช้เข็มเจาะแฉ่งเลือด บริเวณ Ventral sinus ให้ได้ประมาณ 0.7 มิลลิลิตร ผสมเลือดกุ้งและสารป้องกันการแข็งตัวให้เข้ากัน แล้วนำของเหลวที่ได้เทลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 1 หลอด โดยเก็บเลือดอย่างน้อย 3 ตัว/กลุ่ม

2.3.1.2 นำเลือดกุ้งที่ได้ไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge แล้วทำต่อจนจบขั้นตอนเหมือนข้อ 1.1

2.3.2 การสังเคราะห์ First-strand cDNA โดยใช้ปฏิกิริยา Reverse transcription

ให้นำ Total RNA ที่เก็บใน 75% Ethanol มาเขย่าด้วย Vortex mixer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใส ตกตะกอนให้แห้งพอหมาดประมาณ 5 - 10 นาที เติมน้ำกลั่น DEPC treated ประมาณ 12 ไมโครลิตร ทิ้งให้ละลายเข้ากัน แล้วนำมา 2 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่น DEPC treated 68 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 260 - 280 นาโนเมตร เพื่อวัดความเข้มข้นของ RNA แล้วทำต่อจนจบขั้นตอนเหมือนข้อ 1.2

2.3.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR

ให้นำ First-strand cDNA ที่สังเคราะห์ที่ได้จากข้อ 2.3.2 มาเป็น Template เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ AMP, β GBP, Crustin, HSP70, Lysozyme, Penaeidin, Peroxinectin, ProPO, SPI และ TGase และใช้ β -actin เป็นยีนตรวจสอบเปรียบเทียบ โดยใช้ Specific primers ที่ออกแบบโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนซึ่งอ้าง

ถึง Accession number ที่บันทึกไว้ใน GenBank database ของแต่ละยีนในการทำ PCR (ตารางที่ 2) โดยใช้ปริมาณและสภาพของปฏิกิริยาตามคำแนะนำของบริษัท (Takara, Japan) แล้วทำต่อจนจบขั้นตอนเหมือนข้อ 1.3 แล้วทำการอ่านผลโดยพิจารณาจากความหนาแน่นของแบน PCR product

นอกจากนี้ จะทำการชั่งน้ำหนักของกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่มที่ก่อนการทดลอง และภายหลังการให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักกุ้งในแต่ละกลุ่ม ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Specific primers ของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

ยีน	Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด PCR product (bp)	Accession number
1. Antimicrobial Peptide	Forward	5'-CTCGGAGTCATTCTGTTCTG-3'	413	CD766060
	Reverse	5'-TAGAAGGAAGGTGGCTTGCA-3'		
2. β -Glucan Binding Protein	Forward	5'-GAACCATGTGCGAACTTCGCT-3'	701	AF368168
	Reverse	5'-GTGGAAGGATTTACTGCTCG-3'		
3. Crustin	Forward	5'-CGGTTTAGGAGGCGGTTTAA-3'	349	BI018072
	Reverse	5'-CTCCCTAGAAAGAAGGAGG-3'		
4. Heat Shock Protein 70	Forward	5'-ATCGAAGACCACACAGTCC-3'	679	AF474375
	Reverse	5'-ATGCGGTTGTGCGAAGTCTTG-3'		
5. Lysozyme	Forward	5'-AGGTCTTCAGGAAGTGC GAA-3'	469	AF539466
	Reverse	5'-TGACGTGCCAGGCTTG TAAA-3'		
6. Penaeidin	Forward	5'-GGAGGATATCATCCAGTTCC-3'	410	AY326471
	Reverse	5'-CAACAACCAACCACACACAG-3'		
7. Peroxinactin	Forward	5'-CAATGTAAGAAGCACGGTGC-3'	678	AF188840
	Reverse	5'-TGCTC CTCTTGACTCCTCAA-3'		
8. Prophenoloxidase	Forward	5'-CGTCATCCCGAGAAAGAAGG-3'	639	AF099741
	Reverse	5'-TCTCTTGCCAGAAGTGACGT-3'		
9. Serine Proteinase Inhibitor	Forward	5'-CCAGAATCCGGAGTCAATAC-3'	607	CF415875
	Reverse	5'-CAGACGTGTTGCATTCACAG-3'		
10. Transglutaminase	Forward	5'-AAGGCTACGGTTGAAGTGCA-3'	495	AY074924
	Reverse	5'-CCTGAGGTACATCTCCAGAA-3'		
11. β -actin	Forward	5'-CGACATCAAGGAGAAGCTGT-3'	459	CK901489
	Reverse	5'-TCGTA CTCTGCTTGCTGAT-3'		

3. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคเรืองแสงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

3.1 เชื้อเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง *V. harveyi* สายพันธุ์ AQVH001 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) ผสมเกลือแกง 1.5% เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.2 เลือกเชื้อเฉพาะ โคโลนีที่เรืองแสงลงใน Volumetric flask ที่บรรจุ Trypticase Soy Broth ผสมเกลือแกง 1.5% 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงต่อใน Water bath ที่สามารถเขย่าได้ที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

3.3 นำแบคทีเรียที่เลี้ยงได้มาปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง หลังจากนั้นทำการล้างตกตะกอนเซลล์ด้วย น้ำเกลือ 0.85% แล้วนำไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.4 นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาผสมกับน้ำเกลือ 0.85% ปรับให้ได้ Absorbance 0.1 ที่ OD 540 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความหนาแน่นของเซลล์แบคทีเรียประมาณ 1.0×10^8 CFU/มิลลิลิตร ตามวิธีของ (ประพันธ์ศักดิ์, 2542) หลังจากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย น้ำเกลือ 0.85% 9 มิลลิลิตร จะได้เชื้อแบคทีเรียที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.0×10^7 CFU/มิลลิลิตร

3.5 ภายหลังจากเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองในข้อ 2.2.3 เป็นเวลา 14 วัน นำกุ้งในแต่ละถัง มาฉีดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้บริเวณกล้ามเนื้อด้านข้างปล้องท้องที่ 4 ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ตามแบบแผนดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร (กลุ่มควบคุม) จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายแบคทีเรีย ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมผลบวก)

กลุ่มที่ 2 คือ กุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร (กลุ่มควบคุม) จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายเกลือแกง 0.85% ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมผลลบ)

กลุ่มที่ 3 คือ กุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายเบคทีเรีย ดังละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 คือ กุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายเบคทีเรีย ดังละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 5 คือ กุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายเบคทีเรีย ดังละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

3.6 นำกุ้งที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือและเบคทีเรียแล้วในแต่ละกลุ่ม ไปทำการเลี้ยงต่อ ในตู้กระจกความจุ 70 ลิตร แยกตามถังไฟเบอร์กราส โดยแยกเลี้ยงตู้กระจกละ 10 ตัวของแต่ละทรีทเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการให้อาหารและเลี้ยงด้วยอาหารทดลองต่อไป สังเกตและจดบันทึกอัตราการตายของกุ้งทุก ๆ วันจนครบ 12 วัน ระหว่างนี้เมื่อพบกุ้งแสดงอาการใกล้ตายให้แยกออกมา ทำการแยกเชื้อโดยใช้เข็มเขี่ยจากส่วน ตับและตับอ่อน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการยืนยันผลต่อไป

3.7 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารและกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับอาหาร (กลุ่มควบคุมผลบวก) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคจุดขาวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส WSSV

4.1 การเตรียมไวรัส WSSV

4.1.1 ทำการแยกไวรัส WSSV ตามวิธีของ (Xie *et al.*, 2005) โดยนำเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อของกุ้งที่แสดงอาการของโรคจุดขาวและผ่านการทดสอบ PCR แล้วว่าเกิดผลบวกของเชื้อ WSSV ประมาณ 10 กรัม มาบดโดยใช้โกร่งบดแล้วเติม TNE บัฟเฟอร์ 500 มิลลิลิตร [50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5 ร่วมกับ protease inhibitors, 1 mM

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine และ 1 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$] นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ $3,500\times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.1.2 นำของผสมที่ได้ไปกรองด้วย Nylon membrane ขนาดตา 400 mesh แล้วนำส่วนของเหลวที่กรองได้ไปปั่นที่ความเร็วรอบ $30,000\times g$ เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.1.3 คูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกเบา ๆ ทำการละลายตะกอนสีขาวด้านล่างด้วย TM บัฟเฟอร์ (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7.5) 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ $3,500\times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส และปั่นต่อที่ความเร็วรอบ $30,000\times g$ เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส

4.1.4 คูดสารละลายด้านบนออกเบา ๆ ให้เหลือเฉพาะตะกอนขาว ๆ แล้วเติม TM บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ที่มี NaN_3 ความเข้มข้น 0.1% จนกว่าจะนำไปใช้

4.2 การทดสอบเพื่อหาระดับความเข้มข้นของไวรัสที่เหมาะสมในการฉีดเข้าตัวกุ้งเพื่อทดสอบความคุ้มโรค

4.2.1 ทำการเลี้ยงกุ้งกุลาดำขนาด 12 - 14 กรัม ในน้ำเค็ม 15 ส่วนในพัน ในตู้กระจกขนาด 70 ลิตร ที่มีการให้อากาศ ตู้ละ 10 ตัว ทั้งหมด 10 ตู้ ให้อาหารเม็ดที่ไม่ผสมเบต้า-กลูแคน เป็นเวลา 7 วัน ระหว่างนี้ทำการถ่ายน้ำ 20% ทุก ๆ 2 วัน

4.2.2 นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1.4 มาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Lobster Haemolymph Medium (LHM) ครั้งละ 100 เท่า ให้ได้ความเข้มข้นของไวรัสเป็น 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} และ 10^{-8} ตามลำดับ

4.2.3 หลังจากปรับสภาพกุ้งทดลองเป็นเวลา 7 วัน แล้ว ทำการฉีดกุ้งทดลองที่เตรียมไว้บริเวณกล้ามเนื้อด้านข้างลำตัวของปล้องท้องที่ 3 หรือ 4 ด้วยสารละลายไวรัสที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.2 โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ตู้ที่ 1 และ 2 นีคกึ่งทุกตัวด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุม)
- กลุ่มที่ 2 ตู้ที่ 3 และ 4 นีคกึ่งทุกตัวด้วยสารละลายไวรัสความเข้มข้น 10^{-2} ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 3 ตู้ที่ 5 และ 6 นีคกึ่งทุกตัวด้วยสารละลายไวรัสความเข้มข้น 10^{-4} ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 4 ตู้ที่ 7 และ 8 นีคกึ่งทุกตัวด้วยสารละลายไวรัสความเข้มข้น 10^{-6} ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 5 ตู้ที่ 9 และ 10 นีคกึ่งทุกตัวด้วยสารละลายไวรัสความเข้มข้น 10^{-8} ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร

4.2.4 ทำการเลี้ยงกึ่งทดลองต่อไปอีกประมาณ 3 สัปดาห์ ระหว่างนี้ทำการสังเกตลักษณะและอาการของกึ่ง เมื่อพบว่ากึ่งตัวใดแสดงอาการอนึ่ง มีการตอบสนองน้อยมากหรือแสดงอาการของโรคดวงขาวให้นำกึ่งเหล่านั้นออกจากตู้กระจก เพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ต่อไป และทำการบันทึกอัตราการตายสะสมทุกวัน จนกว่าจะสิ้นสุดการทดลองที่ 20 วัน

4.3 การทดสอบความคุ้มโรค หรือผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคไวรัสดวงขาว

4.3.1 ภายหลังจากเลี้ยงกึ่งด้วยอาหารทดลองในข้อ 2.2.3 เป็นเวลา 14 วัน แล้ว นำกึ่งในแต่ละถังมาฉีดเชื้อไวรัสในระดับที่สามารถฆ่ากึ่งได้ 100% หรือใกล้เคียง และไม่ทำให้เกิดการตายอย่างเฉียบพลันจนเกินไปซึ่งได้จากการศึกษาในข้อ 4.2 บริเวณกล้ามเนื้อด้านข้างปล้องท้องที่ 4 ตัวละ 0.1 มิลลิลิตร ตามแบบแผนดังต่อไปนี้

กึ่งกลุ่มที่ 1 คือ กึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร (กลุ่มควบคุม) จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยสารละลายไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งตาย 100% หรือใกล้เคียง ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมผลบวก)

กึ่งกลุ่มที่ 2 คือ กึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร (กลุ่มควบคุม) จำนวน 3 ถัง ให้ฉีดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร (กลุ่มควบคุมผลลบ)

กึ่งกลุ่มที่ 3 คือ กึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถึง ให้ฉีดด้วยสารละลายไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งตาย 100% หรือใกล้เคียง ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

กึ่งกลุ่มที่ 4 คือ กึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถึง ให้ฉีดด้วยสารละลายไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งตาย 100% หรือใกล้เคียง ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

กึ่งกลุ่มที่ 5 คือ กึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จำนวน 3 ถึง ให้ฉีดด้วยสารละลายไวรัสในอาหารเลี้ยงเชื้อ LHM ความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งตาย 100% หรือใกล้เคียง ถึงละ 10 ตัว ๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร

4.3.2 นำกึ่งในแต่ละกลุ่มไปเลี้ยงต่อในตู้กระจกความจุ้น้ำ 70 ลิตร แยกตามถังไฟเบอร์กลาส โดยแยกเลี้ยงตู้กระจกละ 10 ตัวของแต่ละทรีทเมนต์ ๆ ละ 3 ซ้ำ ทำการให้อาหารและเลี้ยงด้วยอาหารทดลองต่อไป ระหว่างนี้ทำการสังเกตลักษณะและอาการของกึ่ง เมื่อพบว่ากึ่งตัวใดแสดงอาการอนึ่ง มีการตอบสนองน้อยมากหรือแสดงอาการของโรคดวงขาวให้นำกึ่งเหล่านั้นออกจากตู้กระจก เพื่อนำไปตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ต่อไป และทำการบันทึกอัตราการตายสะสมทุกวัน จนกว่าจะสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน

4.3.3 ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการตายสะสมของกึ่งในแต่ละกลุ่มทดลองที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร (กลุ่มควบคุม) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของกึ่งในแต่ละกลุ่มที่วันต่าง ๆ ของการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ระยะเวลาในการทดลอง

ใช้ระยะเวลาในการทำวิจัยทั้งสิ้น 12 เดือน (เดือนมกราคม 2550 – เดือนมกราคม 2551)
โดยทำการทดลองในห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบถึงกลไกการตอบสนองของยีนที่ควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดย
เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เบต้า-กลูแคนในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสมให้เกิด
ประสิทธิภาพมากที่สุด

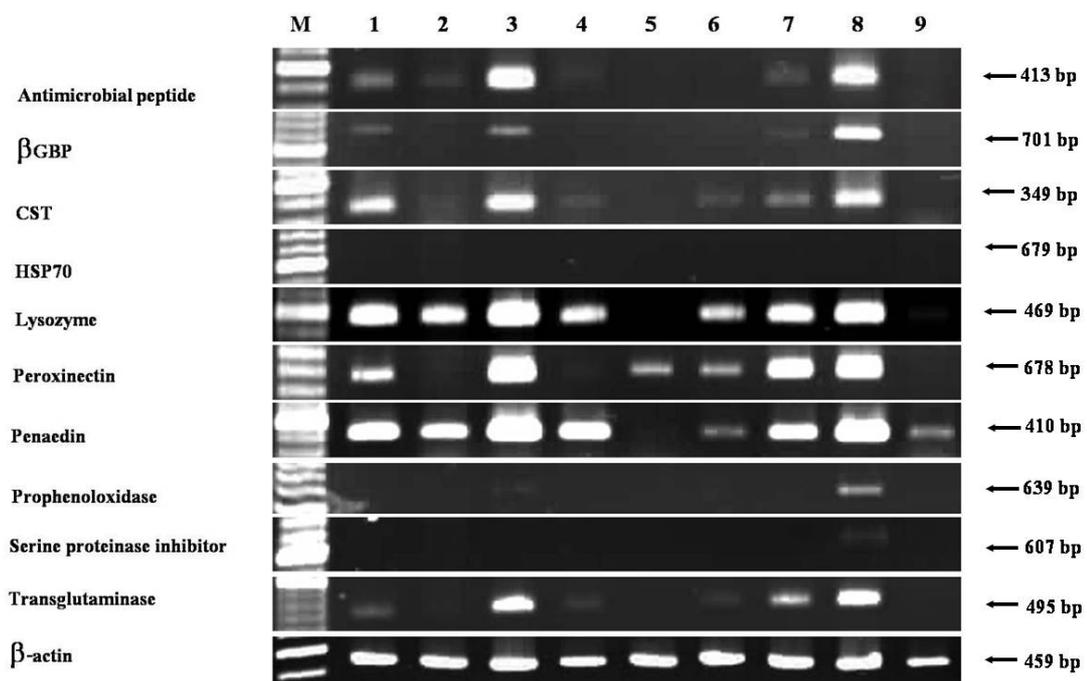
8. แหล่งทุนสนับสนุน

กองทุนส่งเสริมและพัฒนาการวิจัยคณะประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ



ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีน AMP, β GBP, Crustin, HSP70, Lysozyme, Peroxinectin, Penaedin, ProPO, SPI, TGase และ β -actin ที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ 1; หัวใจ, 2; ตับและตับอ่อน, 3; เหงือก, 4; เนื้อเยื่อได้เปลือก, 5; ลำไส้ส่วนหน้า, 6; ลำไส้ส่วนกลาง, 7; ลำไส้ส่วนท้าย, 8; เม็ดเลือด และ 9; กล้ามเนื้อ ในกุ้งกุลาดำปกติ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

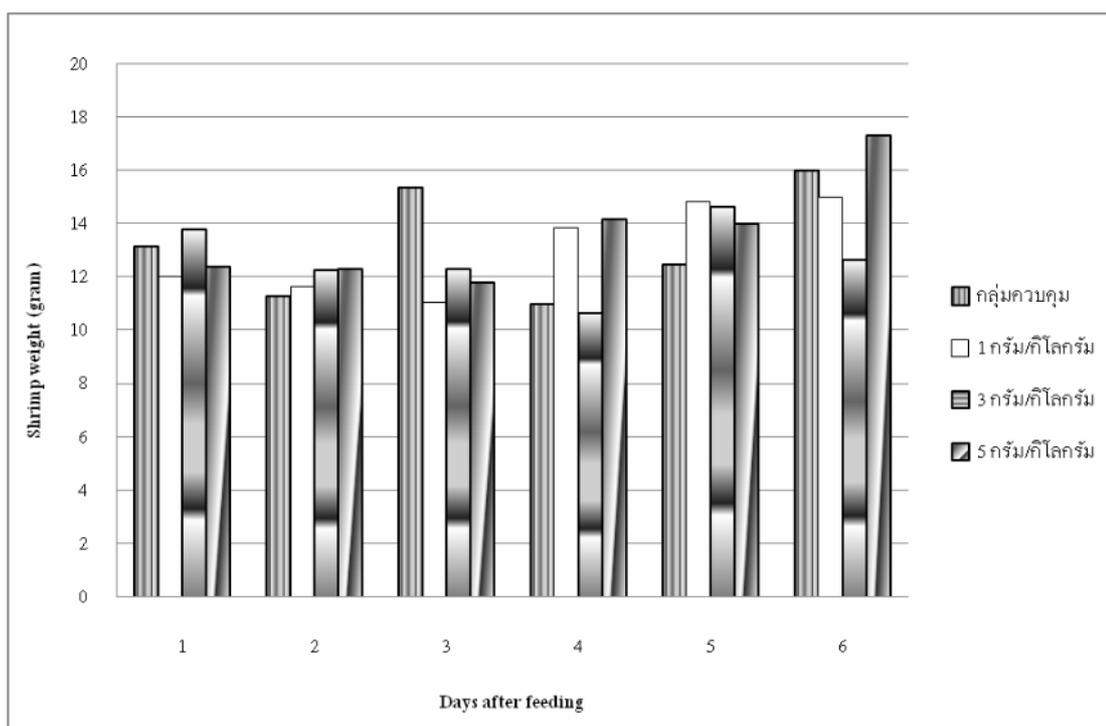
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำปกติขนาดประมาณ 12 กรัม ซึ่งแสดงในภาพที่ 3 พบว่ายีน β -actin ซึ่งทำหน้าที่เป็นยีนเปรียบเทียบหรือเพื่อแสดงสภาพการทำงานของเซลล์มีชีวิต พบว่ามีการแสดงออกในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในทุกอวัยวะ ส่วนยีน AMP ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่ามีการแสดงออกมากในส่วน

ของเหงือก และเม็ดเลือด ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกมาบ้างในส่วนของ หัวใจ ตับ และตับอ่อน และลำไส้ส่วนท้าย ขณะที่ยีน β GBP ซึ่งทำหน้าที่เป็น Pattern Recognition Protein ชนิดหนึ่ง พบว่ามีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด และสามารถพบการแสดงออกระดับเบาบางในส่วนของ หัวใจ เหงือก และ ลำไส้ส่วนท้ายด้วย ยีนต่อมาคือ Crustin ซึ่งเป็น AMP ชนิดหนึ่ง พบว่ามีระดับการแสดงออกมากในส่วนของ หัวใจ เหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกระดับเบาบางในส่วนของ ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เป็ลือก ลำไส้ส่วนกลาง และลำไส้ส่วนท้าย ขณะที่ยีน HSP70 ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียด พบว่าไม่มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ศึกษา

ยีน Lysozyme ซึ่งเป็น AMP ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ในการฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรีย พบว่ามีการแสดงออกมากในเกือบทุกอวัยวะที่ศึกษาได้แก่ หัวใจ ตับและตับอ่อน เหงือก เนื้อเยื่อได้เป็ลือก ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย และเม็ดเลือด โดยเฉพาะในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด ยกเว้นในส่วนของ ลำไส้ส่วนหน้า และกล้ามเนื้อ ที่ไม่พบการแสดงออก ยีนต่อมาคือ Peroxinectin ซึ่งทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับการเกาะติดของเซลล์ และยังเกี่ยวข้องกับระบบ ProPO พบว่ามีการแสดงออกของยีนมากในส่วนของ เหงือก ลำไส้ส่วนท้าย และเม็ดเลือด และมีการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของหัวใจ ลำไส้ส่วนหน้า และลำไส้ส่วนกลาง โดยไม่พบว่ามีการแสดงออกในส่วนของตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เป็ลือก และ กล้ามเนื้อ ขณะที่ยีน Penaeidin ซึ่งจัดเป็น AMP ชนิดหนึ่งเช่นกันพบว่ามีแสดงออกหนาแน่นมากในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกมากในส่วนของหัวใจ ตับ และตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เป็ลือก และลำไส้ส่วนท้าย และยังพบว่ามีการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของลำไส้ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในส่วนของลำไส้ส่วนหน้า ยีนต่อมาคือ ProPO พบว่ามีการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของเม็ดเลือดเท่านั้น โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในอวัยวะอื่น ๆ ที่ศึกษา ขณะที่ยีน SPI ทำหน้าที่เกี่ยวกับการต้านทานและจำกัดการทำงานของเอนไซม์ในจุลชีพ พบว่ามีการแสดงออกระดับเบาบางมากในส่วนของเม็ดเลือดเท่านั้น โดยไม่พบว่ามีแสดงออกในอวัยวะอื่น ๆ ที่ศึกษา ขณะที่ยีนชนิดสุดท้ายคือ TGase ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกมากในส่วนของเหงือกและเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกระดับเบาบางในส่วนของหัวใจ เนื้อเยื่อได้เป็ลือก ลำไส้ส่วนกลาง และลำไส้ส่วนท้าย

2. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

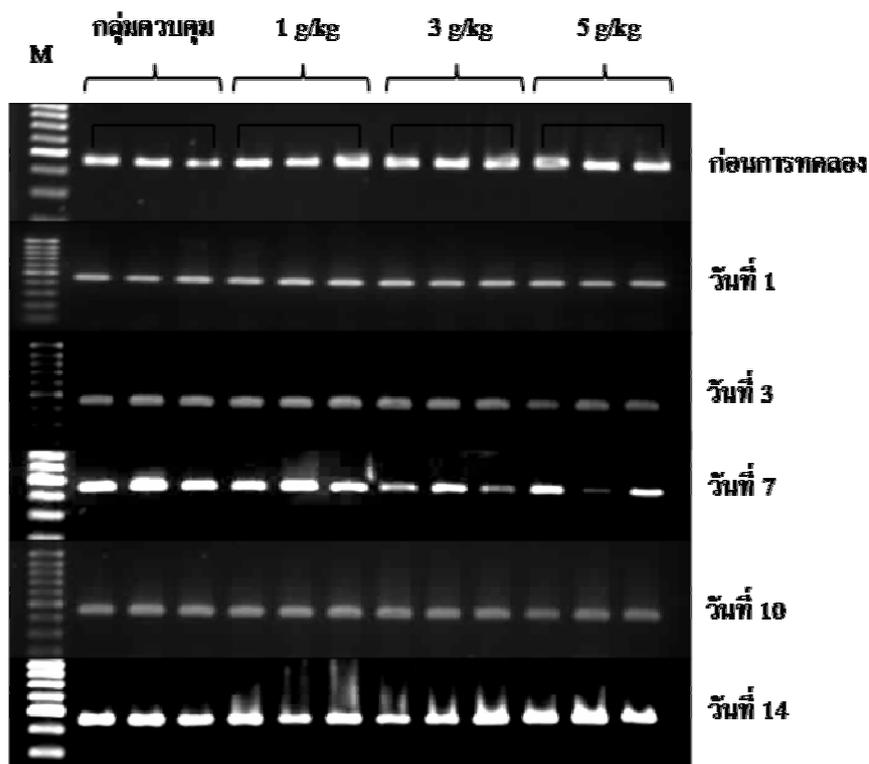
จากการสังเกตค่าน้ำหนักของกุ้งทดลองในชุดควบคุมและกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารพบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งเมื่อเริ่มต้นทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 12.85 ± 0.69 กรัม ภายหลังจากเลี้ยงกุ้งทดลองแล้วเป็นเวลา 1 - 7 วัน น้ำหนักของกุ้งทดลองในทุก ๆ กลุ่ม ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 10 และ 14 ภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยในวันที่ 14 อยู่ในช่วงประมาณ 15.25 ± 1.97 กรัม อย่างไรก็ตามไม่พบว่ากุ้งในแต่ละกลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยที่วันต่าง ๆ ภายหลังจากได้รับอาหารทดลองมีน้ำหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 น้ำหนักของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่มีเบต้า-กลูแคนในระดับต่าง ๆ กัน เมื่อเริ่มต้นการทดลองจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน

2.1 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน β -actin

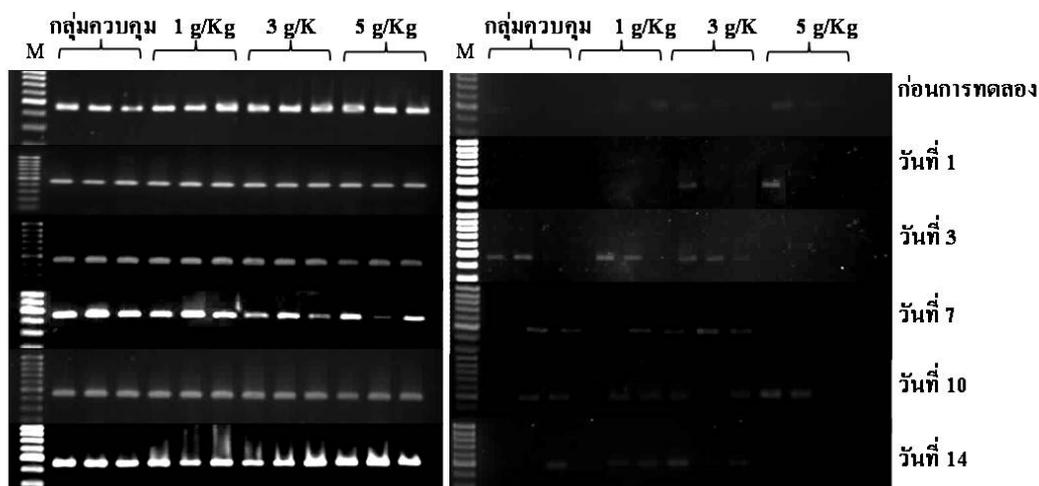
β -actin ยีนจัดเป็นยีน โครงสร้างที่มีความสำคัญต่อเซลล์ในเซลล์พืชและสัตว์ทุกชนิด ทำหน้าที่ค้ำจุนเซลล์ให้มีรูปร่างและโครงสร้างภายในที่เป็นปกติ ซึ่งโดยปกติจะมีการสร้างออกมาในทุกสภาวะไม่ว่าสัตว์จะอยู่ในสภาพที่ปกติหรือได้รับการกระตุ้นจากสิ่งเร้าหรือมีการแสดงอาการผิดปกติหรืออยู่ในสภาพที่เจ็บป่วย จึงถือเป็นหนึ่งใน House keeping gene ที่นิยมใช้เป็นยีนเปรียบเทียบคือ internal control เมื่อต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนอื่น ๆ เพื่อยืนยันว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่กำลังศึกษายังมีชีวิตและยังมีกิจกรรมของเซลล์อยู่ การวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบ Specific primers ของ β -actin ของกุ้งกุลาดำ โดยมีขนาดของ PCR product ประมาณ 459 bp ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ความหนาของแถบ PCR Product ของกุ้งในแต่ละกลุ่มแตกต่างกันไม่มาก และมีแนวโน้มลดการแสดงออกลงในวันแรกของการให้อาหารทดลอง และเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 3, 7, 10 และ 14 วันภายหลังการได้รับอาหารทดลอง (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตาม ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 3 และ 7 ของการทดลอง กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกค่อนข้างน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งกลุ่มอื่น ๆ



ภาพที่ 5 การแสดงออกของ β -actin ยีน โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกึ่งกลูตาต้าที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อน การทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.2 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70)

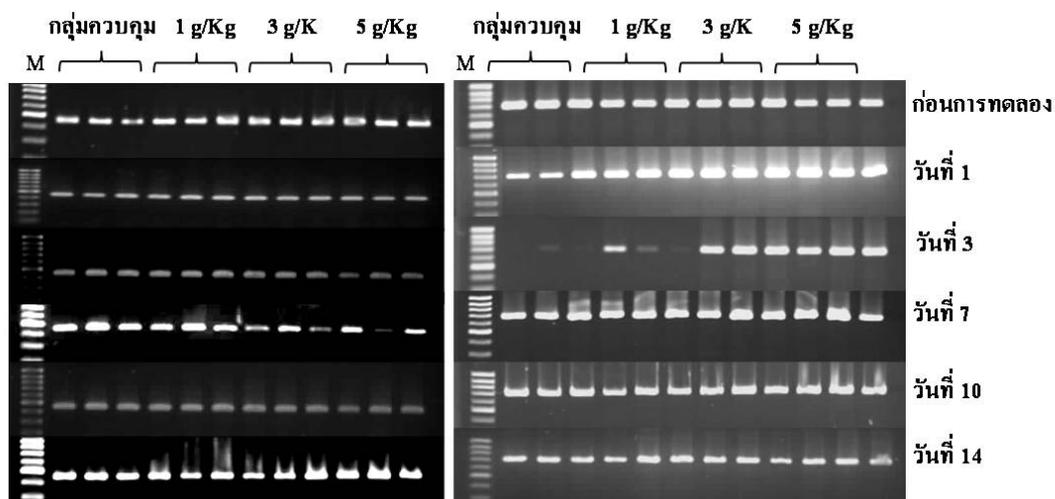
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า นับตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง กึ่งทดลองในทุก ๆ กลุ่มมีการสร้าง HSP ออกมามาก โดยพบว่าการแสดงออกมาในบางช่วงเวลาเท่านั้น โดยจะสามารถสังเกตเห็นแถบ PCR products บาง ๆ บ้างในวันที่ 3 ของการให้อาหารทดลอง (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง ไม่ได้มีสภาพแวดล้อมหรือตัวกระตุ้นใดเกิดขึ้นจนมีผลให้กึ่งทดลองเกิดความเครียดแล้วทำให้กึ่งในทุกกลุ่มมีการเกิดภาวะความเครียดขึ้น และยังคงแสดงให้เห็นว่า กึ่งทดลองที่ได้รับเบต้า-กลูแคน ตั้งแต่ระดับ 1 กรัม ไปจนถึง ความเข้มข้นในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน ไม่ได้ทำให้กึ่งทดลองเกิดความเครียดในระดับวิกฤตขึ้นแต่อย่างใด



ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีน HSP70 เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกึ่งกลูตาต้าที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.3 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Serine Proteinase Inhibitor (SPI)

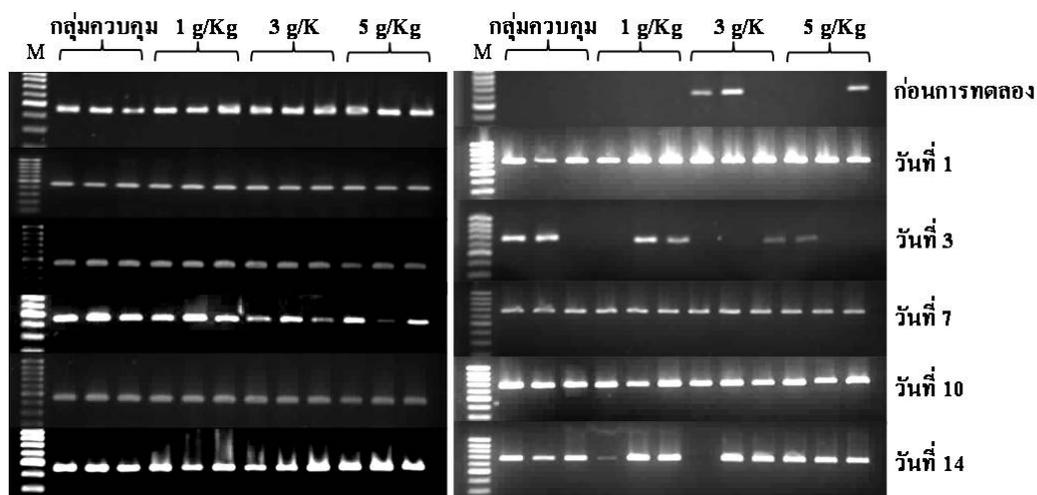
ผลจากการศึกษาพบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลอง SPI เป็นยีนที่มีการแสดงออกในระดับสูง ดังจะเห็นได้จากความหนาของแถบ PCR products ของกึ่งในแต่ละกลุ่มมีความหนามากในทุก ๆ กลุ่มทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับเบต้า-กลูแคน เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาของ PCR products ของ β -actin ยีน อย่างไรก็ตามภายหลังจากเริ่มให้อาหารทดลองแล้วเป็นเวลา 1 วัน ความเข้มของแถบ PCR products ของกลุ่มควบคุมเริ่มมีการแสดงออกลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งตรงกันข้ามกับกึ่งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร กลับมีการแสดงของยีน SPI เพิ่มขึ้นอย่างมากในทุก ๆ กลุ่ม และในวันที่ 3 ของการทดลอง การแสดงออกของยีน SPI มีแนวโน้มลดลงไปในทุก ๆ กลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่มีการแสดงออกที่เบาบางมาก ขณะที่กึ่งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังมีการแสดงออกที่ค่อนข้างหนาแน่น อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 7 การแสดงออกของยีน SPI มีระดับที่ใกล้เคียงกันมาก และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เช่นเดียวกันจนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การแสดงออกของยีน SPI เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกึ่งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.4 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Peroxinectin

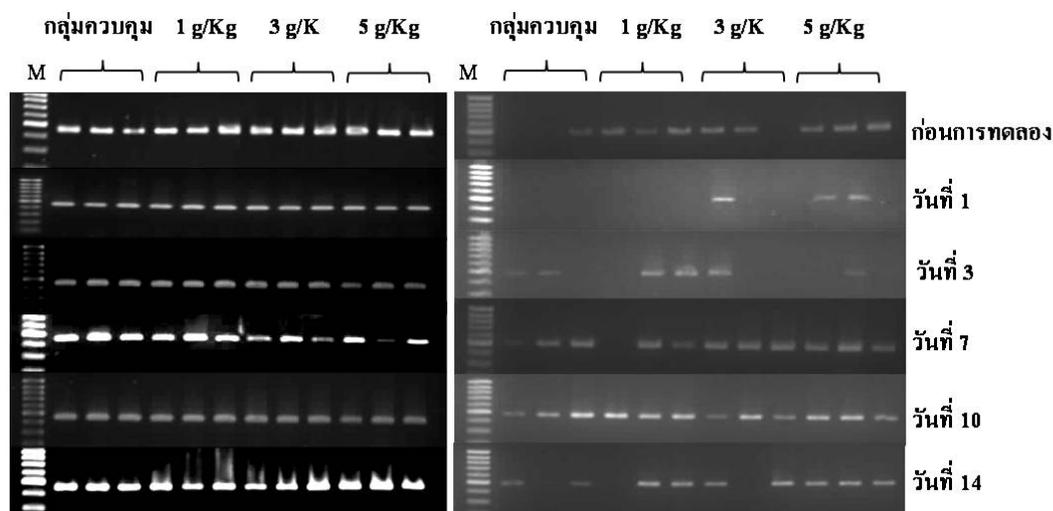
จากการสังเกตพบว่า Peroxinectin จัดเป็นยีนที่มีการแสดงออกมาน้อยมาก ซึ่งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง แทบจะไม่สามารถสังเกตการแสดงออกได้เลยในกึ่งเกือบทุกกลุ่ม ซึ่งสามารถเห็นการแสดงออกได้เพียงสามตัวเท่านั้นจากกึ่งทั้งหมด 12 ตัว อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากเริ่มทดลองแล้วเป็นเวลา 1 วัน กึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนทั้งสามระดับมีการแสดงออกของยีน สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีการแสดงออก ออกมาบ้างอย่างชัดเจน แต่ในวันที่ 3 ของการทดลอง กึ่งในทุกกลุ่มทดลองกลับมีการแสดงออกลดลงแล้วมีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกันในทุกกลุ่ม โดยเริ่มจากวันที่ 7 จนถึงวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การแสดงออกของยีน Peroxinectin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกิ้งกูดดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.5 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Transglutaminase (TGase)

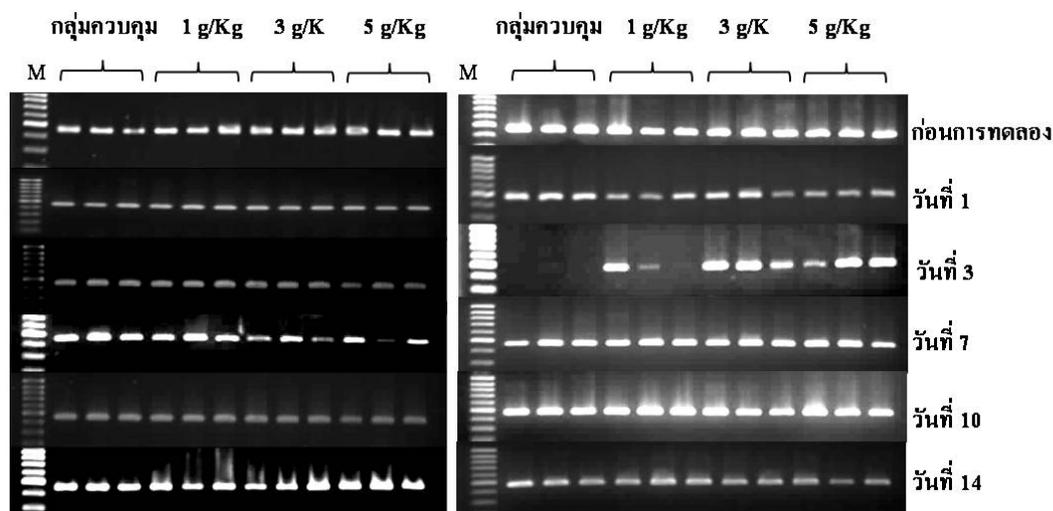
ที่ก่อนการทดลองจากการสังเกตการแสดงออกของยีน TGase พบว่า กิ้งในทุกล้อมีการแสดงออกเบาบางมากเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนอื่น ๆ และแทบจะไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกได้ในวันที่ 1 และ 3 หลังการทดลองในกิ้งทุกล้อม อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 7 พบว่า การแสดงของยีน TGase นี้มีเพิ่มสูงขึ้น และสูงขึ้นสูงสุดในวันที่ 10 ของการทดลอง แต่ก็มีแนวโน้มลดลงอีกครั้งในวันสุดท้ายของการทดลอง อย่างไรก็ตามระดับของการแสดงออกของกิ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนทั้งสามระดับ ยังมีแนวโน้มของการแสดงออกสูงกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การแสดงออกของยีน TGase เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.6 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Lysozyme

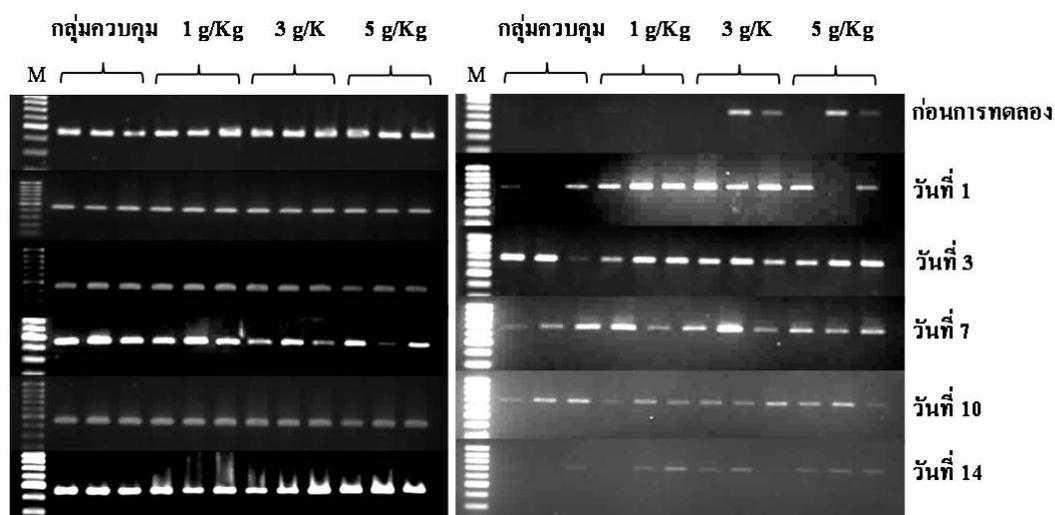
จากการสังเกตการแสดงออกของยีน Lysozyme ที่ก่อนการทดลอง จะพบว่ายีน Lysozyme จัดเป็นยีนที่มีการแสดงออกหนาแน่นมากในทุก ๆ กลุ่ม แต่การแสดงออกมีแนวโน้มลดลงในทุก ๆ กลุ่ม ในวันที่ 1 ของการทดลอง โดยเฉพาะกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนกลับมาแสดงออกอย่างหนาแน่นมากในเกือบทุก ๆ ตัว ขณะที่กุ้งที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคน กลับไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกเลย อย่างไรก็ตามในวันที่ 7 ของการให้อาหารทดลอง การแสดงออกของ Lysozyme ในกุ้งกลุ่มควบคุม มีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนกลับมีการแสดงออกลดลงในเกือบทุกตัว แต่ระดับความหนาแน่นของการแสดงออกก็ไม่แตกต่างกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แล้วหลังจากนี้ระดับการแสดงออกของ Lysozyme มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากในระดับที่ใกล้เคียงกับเมื่อก่อนการทดลองและลดลงอีกครั้งในวันที่ 14 เช่นเดียวกันในกุ้งทุกกลุ่ม (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การแสดงออกของยีน Lysozyme เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกึ่งกลูตาต้าที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.7 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน β -Glucan Binding Protein (β GBP)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน β GBP พบว่าเมื่อก่อนการได้รับอาหารทดลอง พบว่ามีการแสดงออกบ้างเล็กน้อยในกึ่งบางตัวในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม แต่เมื่อได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 1 วัน ในกึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับ 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกของ ยีน β GBP ค่อนข้างหนาแน่น มากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างไรก็ตามในวันที่ 3 กึ่งทุกกลุ่มมีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 ของการได้รับอาหารทดลอง และมีแนวโน้มเดียวกันในการแสดงออกที่เริ่มลดลงเรื่อย ๆ ในวันที่ 7, 10 และ 14 ของการได้รับอาหารทดลองตามลำดับ และในวันที่ 14 ถึงแม้ว่าการแสดงออกจะลดลงและเบาบางในทุกกลุ่มแต่กึ่งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารยังมีความหนาของแบน PCR ที่หนากว่ากลุ่มควบคุมที่แสดงออกเบาบางมากจนแทบสังเกตไม่เห็น (ภาพที่ 11)

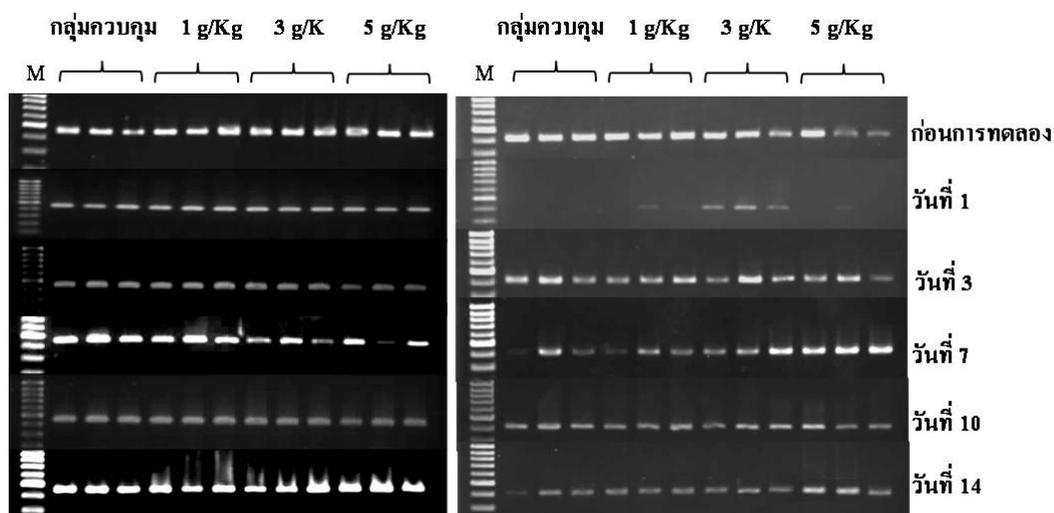


ภาพที่ 11 การแสดงออกของยีน β GBP เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของ กุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.8 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Antimicrobial Peptide (AMP)

เมื่อก่อนเริ่มการทดลอง สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกของยีน AMP ว่ามีการแสดงออกที่ค่อนข้างหนาแน่น อย่างไรก็ตามภายหลังจากได้รับอาหารทดลองแล้วเป็นเวลา 1 วัน กุ้งทุก ๆ ตัวในทุก ๆ กลุ่มมีการแสดงออกของยีน AMP ลดลงจนแทบไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกได้ ยกเว้นกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และในวันที่ 3 กุ้งทุกกลุ่มเริ่มมีอัตราการแสดงออกเพิ่มขึ้นแต่มีระดับที่ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในวันที่ 7 กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมมีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างกันกับกุ้งในกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน รองลงมาคือกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ขณะที่กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกที่เบาบางใกล้เคียงกันและในวันที่ 10 กุ้งทั้งสองกลุ่มนี้มีแนวโน้มของการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นซึ่งแตกต่างกับกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีแนวโน้มลดลง จนการแสดงออกไม่แตกต่างกัน

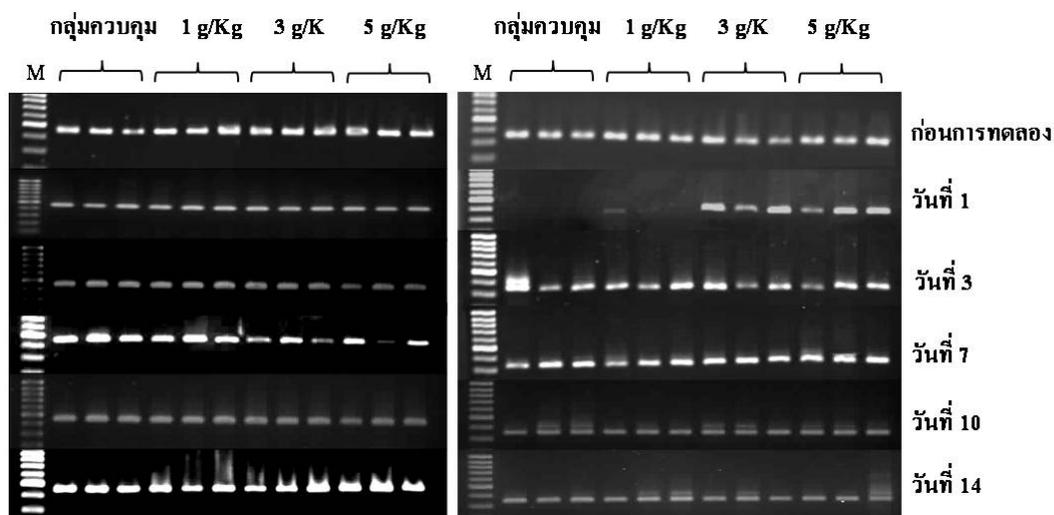
ในทุก ๆ กลุ่ม และมีแนวโน้มลดลงอีกทุกกลุ่มในวันที่ 14 ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ยังมีการแสดงออกมากกว่ากึ่งในกลุ่มอื่น ๆ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 การแสดงออกของยีน AMP เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกึ่งกลูตาต้าที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร และได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารใน อัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.9 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Crustin

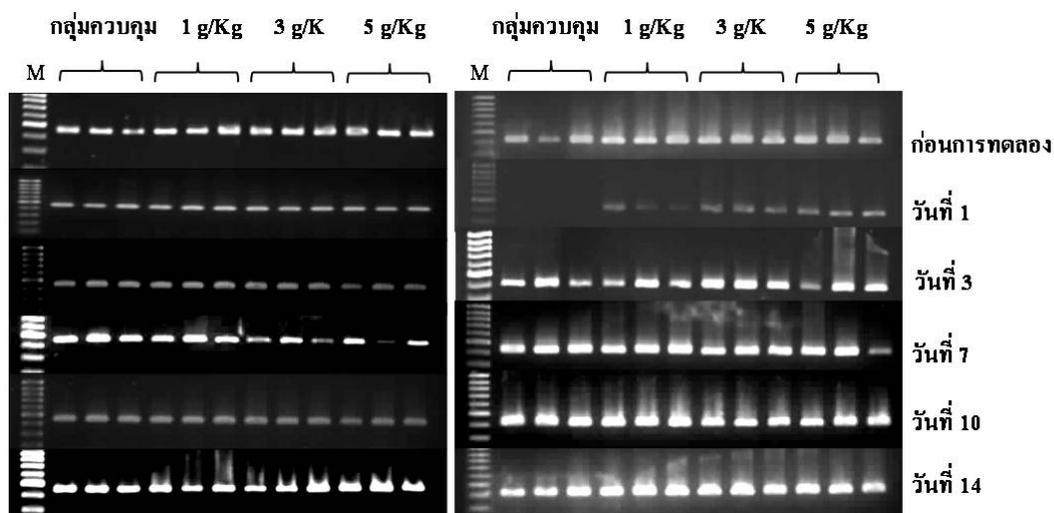
ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Crustin พบว่าที่ก่อนการให้อาหารทดลองระดับการแสดงออกของยีนชนิดนี้มีระดับปานกลางและมีระดับแตกต่างกันไม่มากนัก แต่เมื่อให้อาหารทดลองแล้วเป็นเวลา 1 วัน กึ่งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงลดลงในระดับที่เบาบางจนแทบไม่สามารถสังเกตเห็นได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับกึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ส่วนใหญ่กึ่งมีการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 3 และ 7 ระดับการแสดงออกของยีน Crustin มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ กลุ่ม แต่ก็มีระดับการแสดงออกลดลงจนมีระดับเท่ากันและคงที่เท่ากันในทุก ๆ กลุ่มในวันที่ 10 และ 14 ตามลำดับ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การแสดงออกของยีน Crustin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับ เบต้า-กลูแคนในอาหารและได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.10 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Penaeidin

การศึกษาผลของการแสดงออกของยีน Penaeidin ที่ก่อนการให้อาหารทดลองพบว่า ในสถานะที่ยังไม่มีการกระตุ้นกุ้งทุกกลุ่มมีระดับการแสดงออกในระดับที่ค่อนข้างสูง แต่เมื่อได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 1 วัน กุ้งทุกกลุ่มกลับมีการแสดงออกที่ลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกได้เลย ขณะที่กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารทุกกลุ่มยังมีการแสดงออกที่พอที่จะสามารถสังเกตเห็นได้ โดยพบว่าระดับการแสดงออกจะสูงขึ้นตามระดับเบต้า-กลูแคนในอาหารที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าตั้งแต่วันที่ 3 ของการได้รับอาหารทดลอง กุ้งทุกกลุ่มมีแนวโน้มในการแสดงออกของยีน Penaeidin เพิ่มสูงขึ้นอย่างหนาแน่นตามลำดับ จนถึงวันที่ 14 ของการได้รับอาหารทดลอง แต่ในวันดังกล่าว กุ้งในกลุ่มควบคุมมีระดับการแสดงออกลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารทุกกลุ่ม (ภาพที่ 14)

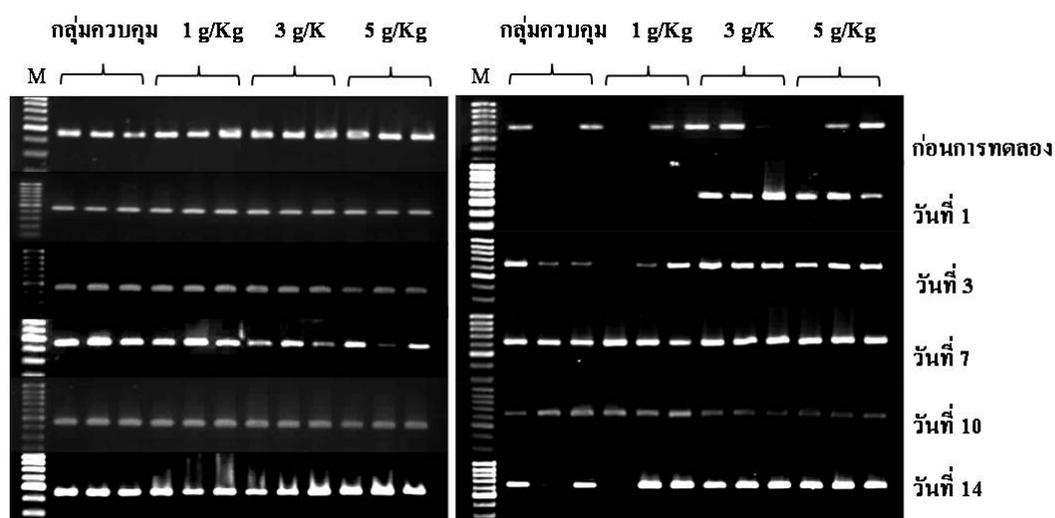


ภาพที่ 14 การแสดงออกของยีน Penaeidin เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับ เบต้า-กลูแคนในอาหารและได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

2.11 การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน Prophenoloxidase

ผลของการศึกษาเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีน ProPO ในกุ้งกุลาดำพบว่า เมื่อก่อนการให้อาหารทดลองพบว่ากุ้งบางตัวของในแต่ละกลุ่มมีการแสดงออกในระดับที่สามารถพอสังเกตได้ อย่างไรก็ตามภายหลังจากได้รับอาหารทดลองแล้วเป็นเวลา 1 วันพบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่สามารถสังเกตเห็นการแสดงออกของยีน ProPO เลย ซึ่งตรงกันข้ามกับ กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีการแสดงออกแตกต่างกับสองกลุ่มแรกอย่างชัดเจน และความแตกต่างดังกล่าวยังสามารถพบได้ในวันที่ 3 ของการได้รับอาหารทดลอง แต่กุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีระดับการแสดงออกของยีน ProPO เพิ่มขึ้น แต่ยังไม่พอกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามในวันที่ 7 กุ้งทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน ProPO เพิ่มขึ้น โดยมีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกัน แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าในวันที่ 10 ของการได้รับอาหารทดลอง กุ้งทุกกลุ่มมีการแสดงออกที่ลดลง โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม

ตามในวันที่ 14 ของการได้รับอาหารทดลอง กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารรวมทั้งกุ้งบางตัวในกลุ่มควบคุมก็กลับมีการแสดงออกของยีน ProPO สูงขึ้นมาอีกครั้ง แต่ก็มีระดับการแสดงออกน้อยกว่ากุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนทุกกลุ่ม (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 การแสดงออกของยีน ProPO เปรียบเทียบกับยีน β -actin โดยใช้เทคนิค RT-PCR ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับ เบต้า-กลูแคนในอาหารและได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ก่อนการทดลอง, 1, 3, 7, 10 และ 14 วัน ตามลำดับ (M คือ DNA มาตรฐาน 100 bp)

3. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคเรืองแสงที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

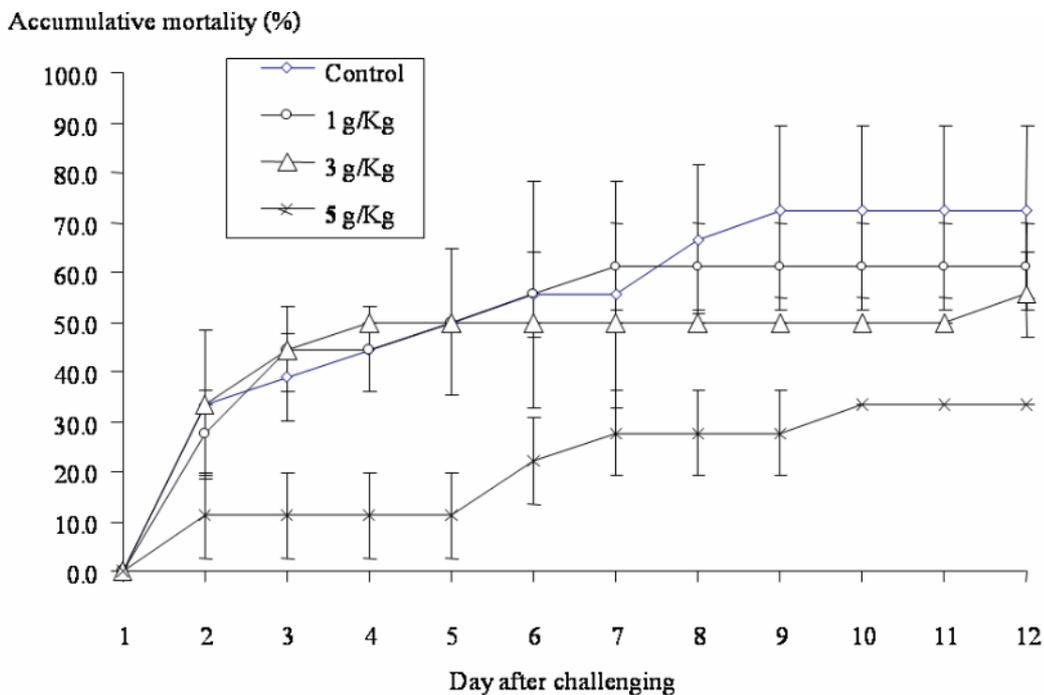
การศึกษาผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ *V. harveyi* พบว่าภายหลังการได้รับเชื้อ *V. harveyi* เป็นเวลา 2 วัน กุ้งทุกกลุ่มเริ่มแสดงอัตราการตายออกมาให้เห็น โดยกุ้งที่ป่วยจะแสดงอาการอนึ่งที่บริเวณก้นตู้กระจกหรือว่ายน้ำอย่างเชื่องช้าและไม่กินอาหาร โดยเฉพาะกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมที่ใกล้เคียงกันซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเป็น $33.3\pm 14.9\%$, $27.8\pm 8.6\%$ และ $33.3\pm 0.0\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราการตายสะสม $11.1\pm 8.6\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) และภายหลังการฉีดเชื้อเป็นวันที่ 2 - 5 อัตราการตายสะสมของกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มของการตายที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นคล้าย ๆ กัน โดยในวันที่ 5 กุ้งทั้งสามกลุ่มนี้มีอัตราการตายสะสมที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีค่าเป็น $50.0 \pm 14.9\%$, $50.0 \pm 0.0\%$ และ $50.0 \pm 0.0\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งยังมีอัตราการตายสะสมคงที่นับจากวันที่ 2 ของการได้รับเชื้อ คือยังมีค่าคงที่ $11.1 \pm 8.6\%$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

อย่างไรก็ตามในช่วงวันที่ 5 - 9 ของการได้รับเชื้อ *V. harveyi* อัตราการตายสะสมของกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เริ่มมีระดับที่สูงขึ้นจาก $11.1 \pm 8.6\%$ ในวันที่ 5 เป็น $27.8 \pm 8.6\%$ เช่นเดียวกับกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเป็น $72.2 \pm 17.2\%$ และ $61.1 \pm 8.6\%$ ตามลำดับ ขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีอัตราการตายสะสมที่ไม่เปลี่ยนแปลงที่ $50.0 \pm 0.0\%$

ในช่วงระหว่างวันที่ 9 - 12 ของการฉีดเชื้อแบคทีเรียอัตราการตายของกุ้งในแต่ละกลุ่มมีค่าที่ค่อนข้างคงที่ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 12 กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเป็น $55.6 \pm 8.6\%$ และ $33.0 \pm 0.0\%$ ซึ่งแตกต่างกันกับกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $72.2 \pm 17.2\%$ และ $61.1 \pm 8.6\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

เพื่อเป็นการยืนยันและแสดงผลของการฉีดเชื้อด้วยแบคทีเรีย *V. harveyi* กุ้งที่แสดงอาการของโรคหรือใกล้ตายได้ถูกนำมาแยกเชื้อจากส่วนตับและตับอ่อน โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS พบว่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ของกุ้งทุกตัวที่แสดงอาการและนำมาแยกเชื้อ มีโคโลนีสีเขียวเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และเมื่อนำจานอาหารไปสังเกตในที่มืดพบว่าโคโลนีสีเขียวเหล่านั้นมีการเรืองแสงออกมาอย่างชัดเจน



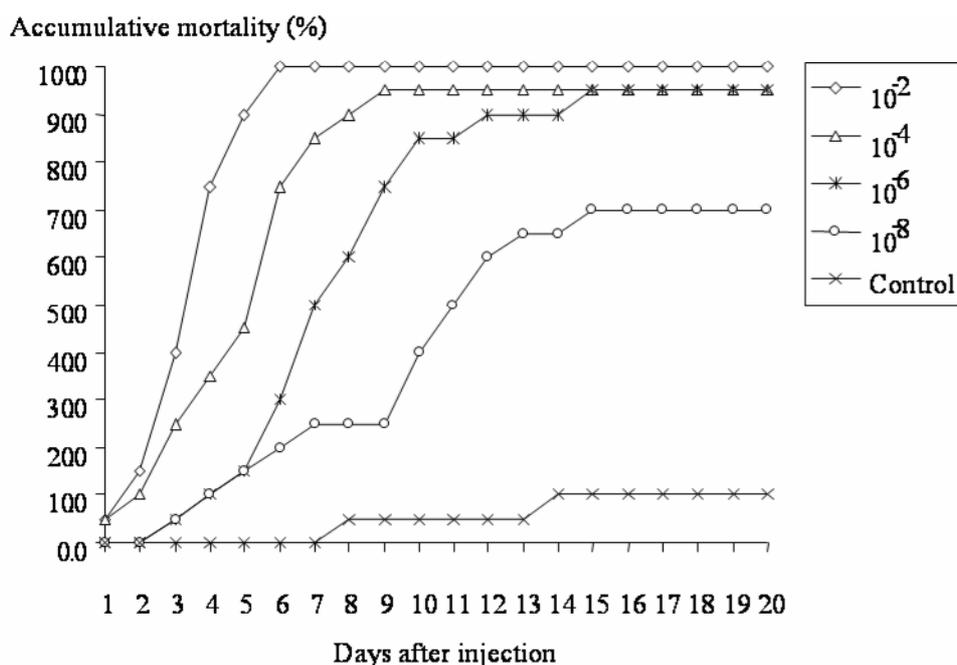
ภาพที่ 16 อัตราการตายสะสมของกุ้งกุลาดำที่ได้รับ เบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับต่าง ๆ กัน ภายหลังจากการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* ในระยะเวลา 12 วัน

4. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคจุดขาวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส WSSV

4.1 การทดสอบเพื่อหาระดับความเข้มข้นของไวรัสที่เหมาะสมในการฉีดเข้าตัวกุ้งเพื่อทดสอบความคุ้มโรค

ผลของการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของไวรัสที่เตรียมได้ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ พบว่า ภายหลังจากการฉีดเชื้อ WSSV กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อที่ความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-4} จะเริ่มแสดงการตายออกมาให้เห็นในวันที่ 1 ขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับการฉีดเชื้อในระดับความเจือจางที่ 10^{-6} และ 10^{-8} จะเริ่มแสดงการตายให้เห็นในวันที่ 3 ของการทดลอง และในช่วงวันที่ 3-6 ของการฉีดเชื้อ อัตราการตายของกุ้งที่ได้รับเชื้อที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} และ 10^{-4} มีอัตราการตายสูงชันอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-2} จะมีอัตราการตายสะสมสูงสุด 100% ในวันที่ 6 ภายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส ส่วนกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-4} มีอัตราการตายสะสมสูงสุดที่ 95% ในวันที่ 9 ภายหลังจากการฉีดเชื้อ ส่วนกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อที่ระดับ

ความเจือจาง 10^{-6} จะมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างช้า ๆ และเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 5-10 และจะมีอัตราการตายสะสมสูงสุดที่ 95% ในวันที่ 15 ภายหลังจากการฉีดเชื้อ ขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสในระดับความเจือจางที่ 10^{-8} จะมีอัตราการตายสะสมเพิ่มสูงขึ้นอย่างช้า ๆ และจะมีอัตราการตายสูงสุดที่ 70% ภายหลังจากได้รับการฉีดเชื้อเป็นเวลา 15 วัน (ภาพที่ 17) ส่วนกุ้งในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสจะมีอัตราการตายสูงสุดที่ 10% เท่านั้น



ภาพที่ 17 อัตราการตายของกุ้งกุลาดำปรกติภายหลังจากการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 วัน

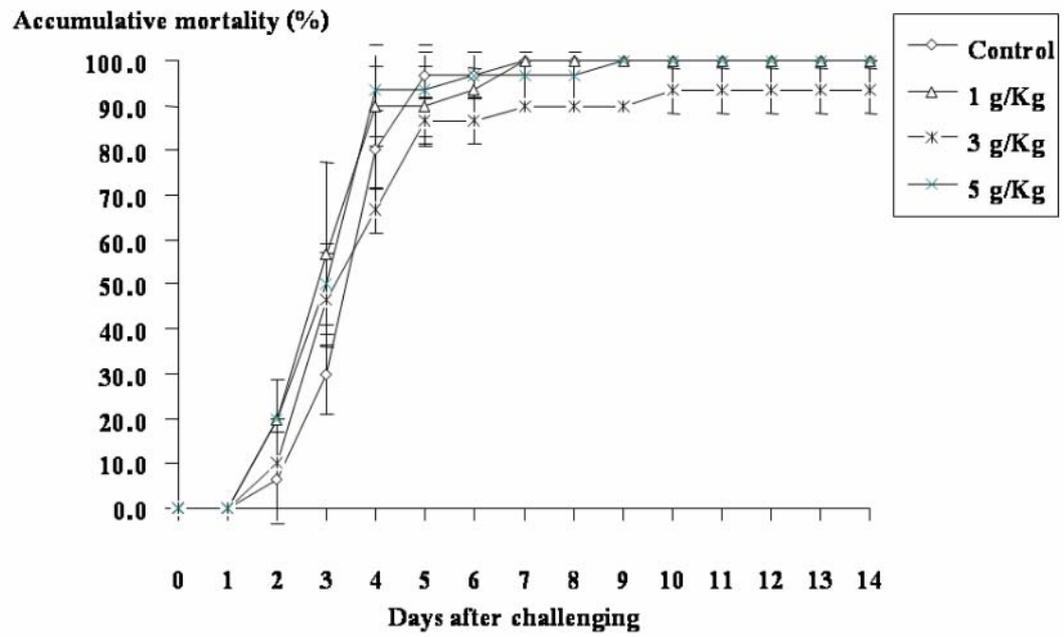
4.2 ผลของการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานโรคไวรัสดวงขาวของกุ้งกุลาดำ

จากการทดลองในข้อ 4.1 พบว่าระดับความเข้มข้นของไวรัสที่เตรียมได้ที่ระดับ 10^{-6} เป็นระดับที่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดลองเพื่อทดสอบความต้านทานหรือทดสอบความคุ้มโรคของกุ้งทดลองที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งทดลองมีอัตราการตายสะสมใกล้เคียง 100% คือ ประมาณ 95% โดยไม่ทำให้กุ้งทดลองตายอย่างเฉียบพลัน จนเกินไปเหมือนกับระดับความเข้มข้นที่ 10^{-2} และ 10^{-4} ที่มีอัตราการตายที่สูงภายในระยะเวลาอัน

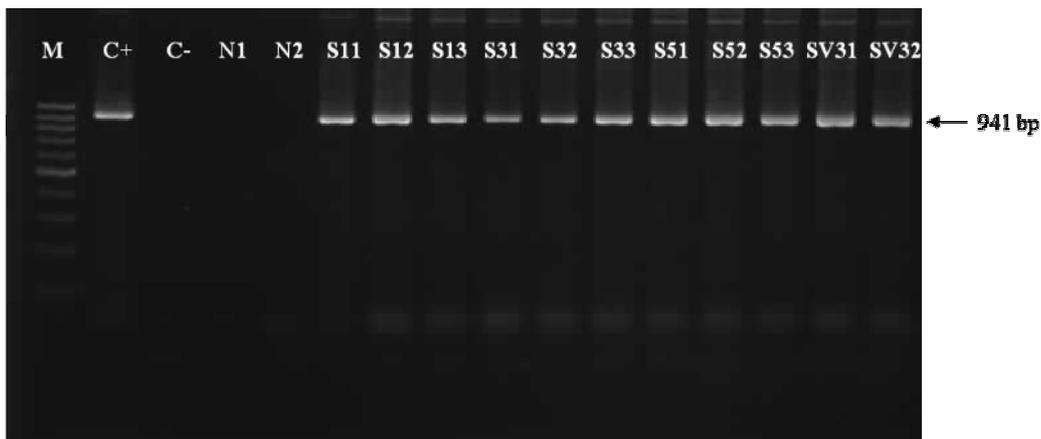
สั้นเพียง 3 - 4 วันเท่านั้น ขณะที่ความเข้มข้นที่ 10^{-8} นั้น จะมีผลทำให้กุ้งเริ่มตายเกิน 50% ต้องใช้เวลานานถึง 12 วัน และกุ้งมีอัตราการตายสะสมสูงสุดเพียง 70% เท่านั้น

เมื่อนำไวรัสที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} มาใช้ในการทดสอบความคุ้มโรคในกุ้งทดลองพบว่า กุ้งทดลองในทุก ๆ กลุ่มจะมีอัตราการตายสะสมสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างวันที่ 3 - 5 ภายหลังจากฉีดไวรัส โดยในวันที่ 3 กุ้งทดลองจะมีอัตราการตายสะสมเป็น $30.0 \pm 8.94\%$, $56.67 \pm 20.66\%$, $46.67 \pm 10.33\%$ และ $50.0 \pm 8.94\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในวันที่ 5 ภายหลังจากฉีดไวรัส กุ้งทุกกลุ่มมีอัตราการตายสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเข้าใกล้ 100% โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $96.67 \pm 5.16\%$, $90.0 \pm 8.94\%$, $86.67 \pm 5.16\%$, $93.33 \pm 10.33\%$ ตามลำดับ และในวันที่ 7 - 8 พบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุม และกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเป็น 100% ขณะที่กุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเป็น 90 ± 0.0 และ $96.67 \pm 5.16\%$ ตามลำดับ และในวันที่ 9 จนถึงวันที่ 14 ภายหลังจากฉีดไวรัส พบว่ากุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เท่านั้นที่ยังมีกุ้งบางตัวที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $93.33 \pm 5.16\%$ ขณะที่กุ้งในกลุ่มอื่น ๆ จะไม่มีกุ้งเหลือรอดเลย โดยจะมีอัตราการตายสะสมครบ 100% ตั้งแต่วันที่ 7 - 9 เป็นต้นไป (ภาพที่ 18)

อย่างไรก็ตามภายหลังจากนำ DNA ที่สกัดได้จากกุ้งที่รอดตายจำนวนสองตัวและกุ้งที่ตายในทุก ๆ กลุ่ม ระหว่างการทดลอง มาทดสอบการติดเชื้อยังพบว่ากุ้งที่เหลือรอด 2 ตัว ในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัมดังกล่าว ยังแสดงผลเป็นบวก ภายหลังจากตรวจสอบเพื่อยืนยันผลด้วยเทคนิค PCR ซึ่งใช้ Specific primers ต่อ DNA ของเชื้อไวรัส WSSV ตามวิธีของ Lo *et al.* (1996) ในการตรวจสอบ ซึ่งจะให้ PCR product ขนาดประมาณ 941 bp ออกมาเช่นเดียวกับกุ้งจากกลุ่มอื่น ๆ ที่ตายระหว่างการทดลอง (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 18 อัตราการตายของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับต่าง ๆ กัน ภายหลังจากการฉีดด้วยเชื้อ WSSV ที่ความเข้มข้น 10^6 ของ Viral stock เป็นเวลา 14 วัน



ภาพที่ 19 ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ตัวอย่าง DNA ต้นแบบจาก DNA ซึ่งสกัดจากกุ้งทดลอง โดยที่ M คือ 100 bp DNA มาตรฐาน, C+ คือ DNA ของ WSSV (ชุดควบคุมผลบวก), C- คือ น้ำกลั่น (ชุดควบคุมผลลบ), N1 - N2 คือ DNA ของ กุ้งปกติ, S11 - S13 คือ DNA ของกุ้งตายที่สุ่มจากกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารใน ระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม, S31 - S33 คือ DNA ของกุ้งตายที่สุ่มจากกุ้งที่ ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม, S51 - S52 คือ DNA ของกุ้งตายที่สุ่มจากกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ SV31 - SV32 คือ DNA ของกุ้งจาก กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่รอดตาย

วิจารณ์

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งกุลาดำ

ในการศึกษานี้ได้เลือกอวัยวะที่ใช้ในการศึกษาคือ หัวใจ ตับและตับอ่อน เหงือก เนื้อเยื่อได้เป็ลือก ลำไส้ส่วนหน้า ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย เม็ดเลือด และกล้ามเนื้อ โดยในแต่ละอวัยวะศึกษาการแสดงออกของยีน 11 ชนิด ดังนี้ AMP, β GBP, Crustin, HSP70, Lysozyme, Peroxinectin, Penacidin, ProPO, SPI, TGase และ β -actin ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า เม็ดเลือดจะพบการแสดงออกของยีนทุกชนิดยกเว้นยีน HSP70 ที่ไม่พบการแสดงออก

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแต่ละชนิดที่พบในอวัยวะต่าง ๆ ชนิดแรกคือ β -actin พบว่ามีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่าอวัยวะที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่ผิดปกติ โดยจะเห็นว่าการแสดงออกที่ความหนาแน่นใกล้เคียงกันทุกอวัยวะ

การศึกษาการแสดงออกของยีน AMP พบว่ามีการแสดงออกมากในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกมาบ้างในส่วนของ หัวใจ ตับและตับอ่อน และลำไส้ส่วนท้าย สอดคล้องกับการศึกษาของ Bachere *et al.* (2004) ได้ศึกษาโดยพิจารณาจากโครงสร้างหน้าที่ การแสดงออกของยีน และการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อเพื่อตอบสนองต่อเชื้อ ในการตรวจสอบในกุ้ง พบว่าการแสดงออกของ AMPs ขึ้นอยู่กับชนิด และการสร้างของเม็ดเลือดซึ่งมีหน้าที่หลักในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

การศึกษาการแสดงออกของยีน β GBP พบว่ามีการแสดงออกพบว่าการแสดงออกของยีนหนาแน่นในเม็ดเลือด และสามารถพบการแสดงออกกระจัดเบาบางในส่วนของ หัวใจ เหงือก และ ลำไส้ส่วนท้ายด้วย เช่นเดียวกับ Romo-Figueroa *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกุ้งพบว่า β GBP-HDL ของกุ้งขาวคล้ายกับ β GBP ของ Crayfish โดย β GBP-HDL มีการแสดงออกในตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ ระบายค้ำว่ายน้ำ และเหงือก แต่พบมากในเม็ดเลือด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR

การศึกษาการแสดงออกของยีน Crustin พบว่ามีระดับการแสดงออกมากในส่วนของ หัวใจ เหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกระดับเบาบางในส่วนของตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เปลือก ลำไส้ส่วนกลาง และลำไส้ส่วนท้าย ซึ่งต่างจาก Rattanachai *et al.* (2004) ที่ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน Crustin-like peptide ในกุ้ง *Marsupenaeus japonicus* ด้วยวิธี RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ เม็ดเลือด ตับและตับอ่อน เหงือก ลำไส้ส่วนหน้า ลำไส้ส่วนกลาง กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อได้เปลือก และรังไข่ พบว่า Crustin ของกุ้งมีการแสดงออกในส่วนเม็ดเลือดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน Crustin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ 1, 3 และ 7 วัน หลังให้อาหารที่ผสมเปปติโดกลัยแคนเมื่อตรวจสอบ โดยวิธี Quantitative Real-time PCR แต่ Zhang *et al.* (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Crustin ในกุ้ง *F. chinensis* ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีแสดงออกมากในเม็ดเลือด และเหงือก และมีการแสดงออกน้อยในส่วนของ หัวใจ รังไข่ และลำไส้ แต่ไม่พบการแสดงออกในส่วนของ ตับและตับอ่อน และกล้ามเนื้อ

การศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 พบว่าไม่มีการแสดงออกในทุกอวัยวะที่ศึกษา ซึ่งหน้าที่ของ HSP70 นั้นจะทำหน้าที่สำคัญคือ ซ่อมแซมโปรตีนที่มีโครงสร้างผิดเพี้ยนหรือไม่สามารถพับตัวได้และไม่สามารถทำงานได้ อันเป็นผลมาจากการเกิดความเครียด ให้กลับไปมีสภาพที่สามารถทำงานได้เช่นเดิม นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการตัดทำลายโปรตีนที่เสียสภาพแล้วส่งออกหรือเก็บไว้ในเซลล์เพื่อนำกลับเอาไปใช้ใหม่ (Kregel, 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Song *et al.* (2006) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 ในเม็ดเลือดของหอยเชลล์ *Argopecten irradians* ต่อการต้านทานแบคทีเรียและ Naphthalin stress ด้วยวิธี Semi-quantitive RT-PCR จากการศึกษาพบว่า *Argopecten irradians* HSP70 (AIHSP70) เป็นสมาชิกในกลุ่มของครอบครัว HSP70 และเมื่อทดสอบการต้านทานแบคทีเรีย *V. anguillarum* และ Naphthalin stress พบว่ามีแสดงออกของยีนสูงสุดที่เวลา 8-16 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า AIHSP70 มีบทบาทเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความเครียด

การศึกษาการแสดงออกของยีน Lysozyme พบว่ามีแสดงออกมากในเกือบทุกอวัยวะที่ศึกษาได้แก่ หัวใจ ตับและตับอ่อน เหงือก เนื้อเยื่อได้เปลือก ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย และเม็ดเลือด โดยเฉพาะในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด มีการแสดงออกหนาแน่นมาก ยกเว้นในส่วนของลำไส้ส่วนหน้า และกล้ามเนื้อ ที่ไม่พบการแสดงออก สอดคล้องกับการศึกษาของ Burge *et al.* (2007) ศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีน Lysozyme ความสำคัญของ Antibacterial protein ที่ผลิตจากเม็ดเลือด และเนื้อเยื่อของ *L. vannamei* โดยศึกษาหาปริมาณ Lysozyme โดยวิธี Real-time PCR

ร่วมกับหา THC ศึกษาการแสดงออกโดยวิธี *in situ* hybridization ในเม็ดเลือด และเนื้อเยื่อ ทดสอบความต้านทานด้วยเชื้อ *V. campbellii* พบว่าเม็ดเลือดมีการเพิ่มจำนวนบริเวณที่มีการฉีดเชื้อเพื่อตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ภายหลังจาก 4 ชั่วโมง Lysozyme มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเม็ดเลือดและเนื้อเยื่อ และกลับมาสู่ระดับปรกติยกเว้นกล้ามเนื้อบริเวณที่ถูกฉีดเชื้อ

การศึกษาการแสดงออกของยีน Peroxinectin พบว่ามีการแสดงออกของยีนมากในส่วนของเหงือก ลำไส้ส่วนท้าย และเม็ดเลือด และมีการแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของหัวใจ ลำไส้ส่วนหน้า และลำไส้ส่วนกลาง โดยไม่พบว่ามีแสดงออกในส่วนของตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เปลือก และ กล้ามเนื้อ สามารถพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดชนิด Semi-granular และ Granular cells และจะมีการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก ProPO จากการศึกษาของ Jiravanichpaisal *et al.* (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเช่น ProPO, Peroxinectin, Crustin, Penaeidin, TGase, Haemocyanin และ Astakine ในระยะ larval ของกุ้งกุลาดำเช่น Nauplius 4, Protozoa 1 และ 3 , mysis 3, post-larvae 3 และเม็ดเลือดของกุ้งระยะ Juveniles ด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR แสดงให้เห็นว่า เริ่มมีการแสดงออกในระยะ Nauplius 4 แต่ในระดับที่ต่างกัน พบ ProPO ต่ำมากที่ระยะ Nauplius 4 ขณะที่ Peroxinectin, Crustin, Penaeidin, TGase, Haemocyanin และ Astakine มีการแสดงออกในทุกระยะ Larval ส่วน Peroxinectin พบมีการแสดงออกน้อยในเม็ดเลือด จึงสันนิษฐานว่า Peroxinectin มีการแสดงออกในเซลล์อื่น ๆ มากกว่าเม็ดเลือด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า Immune-competent ของเม็ดเลือดยังไม่สมบูรณ์ในระยะ Larval

การศึกษาการแสดงออกของยีน Penaeidin พบว่ามีการแสดงออกหนาแน่นมากในส่วนของเหงือก และเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกมากในส่วนของหัวใจ ตับและตับอ่อน เนื้อเยื่อได้เปลือก และลำไส้ส่วนท้าย และยังพบว่ามีแสดงออกในระดับเบาบางในส่วนของลำไส้ส่วนกลาง และกล้ามเนื้อ โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในส่วนของลำไส้ส่วนหน้า สอดคล้องกับการศึกษาของ Kang *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Penaeidin ในกุ้ง *F. chinensis* ด้วยวิธี RT-PCR และ *in situ* hybridization พบว่า Penaeidin มีการแพร่กระจายในเม็ดเลือด (Granular haemocytes), หัวใจ เหงือก ลำไส้ และเนื้อเยื่อได้เปลือก โดยจะพบการแสดงออกในปริมาณมากในเม็ดเลือดเป็นหลัก นอกจากนี้ Kang *et al.* (2007) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Penaeidin ในกุ้ง *F. chinensis* ด้วยวิธี Semi-quantitative RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด เหงือก และลำไส้ และมีการแสดงออกน้อยในส่วนของ หัวใจ และรังไข่ แต่ไม่พบการ

แสดงออกในส่วนของตับและตับอ่อน กระเพาะ และอวัยวะเพศผู้ และจากการศึกษาของ Hu *et al.* (2006) ศึกษาการแสดงออกของยีน Penaeidin-5 ในกุ้งกุลาดำ โดยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกในเม็ดเลือด เหงือก ลำไส้ และ กล้ามเนื้อ ตรวจยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ Western blot พบว่ามีการแสดงออกในปริมาณมากที่เม็ดเลือด ลำไส้ และน้ำเลือด จากการทำ Immunohistochemistry แสดงให้เห็นว่า Penaeidin-5 ในส่วนของเปลือก และเหงือก เป็นด่านแรกในการป้องกันสิ่งแปลกปลอม และในการทดสอบการต้านทานเชื้อ *V. alginolyticus* และ *Aerococcus viridans* ที่ 3 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับเชื้อ Penaeidin-5 มีปริมาณเพิ่มขึ้นและจำนวนแบคทีเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 12 และ 24 ชั่วโมง ขณะที่ Chiou *et al.* (2007) ได้ศึกษารอบครัว penaeidin จากกุ้งกุลาดำ *P. monodon* พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *F. chinensis* (73%), *Farfantepenaeus paulensis* (66%), *L. schmitti* (53–67%), *L. stylirostris* (50–67%), *L. setiferus* (50–62%), *L. vannamei* (44–66%), and *M. japonicus* (33%) ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่า Penaeidin ของกุ้งกุลาดำแตกต่างจาก Penaeidin 1, Penaeidin 2, Penaeidin 3 และ Penaeidin 4 ของกุ้งชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ penaeidin mRNA สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ รวมถึงรังไข่ และ mandibular organ และยังพบ penaeidin mRNA ในเซลล์ระยะ Postlarva สูงกว่า Nauplius I (9 ชั่วโมงหลังจากฟักเป็นตัว) และสูงกว่าระหว่างระยะลอกคราบ แสดงว่าระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงมีการพัฒนาที่ระยะลอกคราบนี้

การศึกษาการแสดงออกของยีน ProPO พบว่ามีการแสดงออกของยีนในระดับเบาบางในส่วนของเม็ดเลือดเท่านั้น โดยไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในอวัยวะอื่น ๆ อย่างเช่นการศึกษาของ Perazzolo and Barracco (1997) พบว่ามากกว่า 90% สามารถพบ ProPO ในเม็ดเลือด ซึ่งแตกต่างจาก Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของยีน ProPO ในกุ้งขาวด้วยวิธี Northern blot แสดงให้เห็นว่า ProPO สร้างมาจากเม็ดเลือดเป็นหลัก และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน ProPO มีการแพร่กระจายในเม็ดเลือด เหงือก หัวใจ, Lymphoid organ, กระเพาะอาหาร ลำไส้, Anterior midgut caecum และ Ganglion และแสดงออกน้อยในส่วนของ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ และ Cuticular epidermis และจากการตรวจสอบโดยเทคนิค *in situ* hybridization ยังแสดงให้เห็นว่า เหงือก หัวใจ กล้ามเนื้อ, Haematopoietic tissue, ตับและตับอ่อน เป็นส่วนที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน ProPO ได้เช่นกัน เช่นเดียวกับ F และ E cell ของตับและตับอ่อน ต่างจากที่ Buda and Thomas (2005) ศึกษาใน Blue crab (*Callinectes sapidus*) พบว่า ppA มีการแสดงออกในระดับต่ำในเม็ดเลือดช่วงที่มีการลอกคราบ แต่ไม่พบในตับและตับอ่อน ขณะที่ Ko *et al.* (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีน ProPO ใน Mud crab (*S. serrata*) พบว่า ProPO มีการ

แสดงออกมากในเม็ดเลือด แต่ไม่พบใน หัวใจ เหงือก ก้านตา กล้ามเนื้อ รั้งไข่ ดับและดับอ่อน กระเพาะ และ ลำไส้ นอกจากนี้ ProPO เพิ่มขึ้นภายหลังจากการฉีดไลโปโพลีแซคคาไรด์เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง และกลับสู่ปรกติภายในเวลา 72 ชั่วโมง

การศึกษาการแสดงออกของยีน SPI พบว่ามีการแสดงออกระดับเบาบางมากในส่วนของ เม็ดเลือดเท่านั้น โดยไม่พบว่ามีแสดงออกในอวัยวะอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kanost (1999) ได้ศึกษา SPI ในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Arthropod พบว่ามีการแสดงออก ในเม็ดเลือดชนิด Granulocyte ซึ่งหน้าที่ของมันเกี่ยวกับการปกป้องโฮสต์จากเชื้อโรคหรือพาราไอซ์ต์ เช่นเดียวกับใน horseshoe crabs จะสังเคราะห์ในเม็ดเลือด (Liang and Soderhall, 1995) ชนิด granule และจะหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อ ควบคุมการสร้าง proteinases ใน hemolymph coagulation cascade (Iwanaga *et al.*, 1998) ศึกษาของ Rattanachai *et al.* (2005) ศึกษา การแสดงออกของยีน SP homologue ในกุ้ง kuruma shrimp (*M. japonicus*) ที่ใช้เปปติโดกลัยแคน ผสมอาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่ามีการแสดงออกในเม็ดเลือดเพิ่มขึ้นภายในเวลา 3 วันหลังจาก ได้รับเปปติโดกลัยแคนผสมอาหาร 0.2 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวันรวมทั้งการศึกษาของ Jimenez-Vega *et al.* (2005) พบว่า SP มีการแสดงออกในเม็ดเลือด แต่ไม่พบในกล้ามเนื้อ hypodermis, หัวใจ, tail stalk, pleopods, ดับและดับอ่อน นอกจากนี้จากการศึกษาของ Vaseeharan *et al.* (2006) ซึ่งได้ศึกษา SP ในเม็ดเลือดของ Mud crab (*Scylla serrata*) ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ามีลำดับเบส คล้ายคลึงกับ Spiny lobster (*Panulirus argus*), Horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) และ Crayfish (*Pacifastaus leniusculus*) 55%, 51% และ 50% ตามลำดับ ซึ่ง SP มีการแสดงออกมากใน เม็ดเลือด และแสดงออกน้อยในส่วนของหัวใจ, ก้านตา และ Antennules แต่มีปริมาณลดลงเมื่ออยู่ใน สภาพ pH 9.5 แต่ก็พบว่าจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นหลังจากฉีด Zymosan เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ การศึกษาของ Lin *et al.* (2006) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน SP homologs ในกุ้งกุลาดำโดยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกมากในเนื้อเยื่อ และมากที่สุด ในเม็ดเลือด นอกจากนี้สามารถ แสดงออกเพิ่มขึ้นภายหลังจากแช่ด้วย เบต้า-กลูแคนเป็นเวลา 12 วัน

การศึกษาการแสดงออกของยีน TGase พบว่ามีการแสดงออกมากในส่วน of เหงือก และ เม็ดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่ามีแสดงออกระดับเบาบางในส่วน of หัวใจ เนื้อเยื่อได้เปปลือก ลำไส้ส่วนกลาง และลำไส้ส่วนท้าย สอดคล้องกับการศึกษาของ Liu *et al.* (2007) ได้ศึกษาการ แสดงออกของยีน TGase ด้วยวิธี RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้ง *F. chinensis* พบว่ามีการแสดง

ออกมาที่ เม็ดเลือด และ Lymphoid organ นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกมาบ้างในส่วนของตับและตับอ่อน หัวใจ ลำไส้ แต่ไม่พบการแสดงออกในส่วนของกล้ามเนื้อ

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดเป็นอวัยวะที่สำคัญในการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในส่วนของเม็ดเลือดมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถพบการแสดงออกได้ในอวัยวะส่วนอื่น ๆ ได้แก่เหงือก ตับและตับอ่อน หัวใจ และลำไส้ส่วนท้าย ซึ่งอาจเพราะเป็นอวัยวะที่มีการหมุนเวียนของเลือดจึงพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่หนาแน่นเช่นกัน

2. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ

2.1 Heat Shock Protein 70

ยีนในกลุ่ม HSPs จัดเป็นยีนที่มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการการเกิดความเครียด ซึ่งพบทั้งในพืชและสัตว์ พบครั้งแรกโดย Ritossa (1962) ในเซลล์ของแมลงหวี่ (Fruit fly, *Drosophila melanogaster*) โดยเขาได้สังเกตว่าเมื่อให้ความร้อนแก่สัตว์ทดลองชนิดนี้ จะมีการสร้างโปรตีนหลาย ๆ ชนิดออกมาตอบสนองต่อการกระตุ้นทุกครั้ง จึงได้ให้ชื่อว่า HSP อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในภายหลังของนักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ กลุ่ม ได้พบว่าไม่ใช่เฉพาะความร้อนเท่านั้นที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง HSP หากทำการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองรับสภาพที่ทำให้สัตว์เกิดความเครียด เช่น การติดเชื้ การอดอาหาร สภาพที่มีโลหะหนัก สารพิษต่าง ๆ การได้รับอากาศไม่เพียงพอ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิให้เย็นกว่าปรกติหรือร้อนกว่าปรกติ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมอย่างเฉียบพลัน ก็สามารถโน้มนำให้เกิดการสร้างโปรตีนในกลุ่มนี้ออกมาได้เช่นเดียวกัน ทำให้นักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ กลุ่มเรียกโปรตีนในกลุ่มนี้ว่า “Stress protein” จากการศึกษาอย่างต่อเนื่องยังพบโปรตีนกลุ่มนี้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งใน Prokaryotes และ Eukaryotes ตั้งแต่แบคทีเรีย พืช จนถึงมนุษย์ โดยสามารถจำแนกและเรียกชื่อกลุ่มตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล เช่น กลุ่มของ HSP60, 70, 90 และ 110 กิโลดาลตัน (kDa) และกลุ่ม Low-molecular weight HSP family (10, 20 และ 40 Kd) โดยยีนในกลุ่มนี้มีหน้าที่สำคัญคือ ซ่อมแซมโปรตีนที่มีโครงสร้างผิดเพี้ยนหรือไม่สามารถพับตัวได้และไม่สามารถทำงานได้ อันเป็นผลมาจากการเกิดความเครียด ให้กลับไปมีสภาพที่สามารถทำงานได้เช่นเดิม นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการตัด

ทำลายโปรตีนที่เสียหายแล้วส่งออกหรือเก็บไว้ในเซลล์เพื่อนำกลับเอาไปใช้ใหม่ (Kregel, 2002) และยังทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย คือ ช่วยในการส่งชิ้นส่วนของ Antigen ของเชื้อโรค และสิ่งแปลกปลอมที่สร้างภายในเซลล์ส่งออกให้กับ Antigen presenting cells เช่น Macrophage จัดจำโครงสร้างดังกล่าวโดยผ่านทางโปรตีน CD91 และยังทำหน้าที่ส่งสัญญาณเตือนภัยออกไปนอกเซลล์เพื่อให้ระบบภูมิคุ้มกันเข้าไปทำลายเซลล์ที่มีการติดเชื้อหรือถูกบุกรุกด้วยเชื้อโรคชนิดต่าง ๆ (Binder *et al.*, 2000; Prohaszka, 2003)

Robert (2003) ได้รายงานไว้ว่า HSPs ยังจัดเป็น Intracellular proteins ที่จะมีการสังเคราะห์ออกมาอย่างรวดเร็วเมื่อมีการรบกวนจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ สภาพการขาดกลูโคส สภาพะที่มีการติดเชื้อ และเนื้อเยื่อที่มีเซลล์มะเร็งกำลังเจริญเติบโต และยังได้สรุปว่า HSP ยังทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการของเปปไทด์หลาย ๆ ชนิดภายในเซลล์ และยังทำหน้าที่ในการลำเลียงแอนติเจน โดยขบวนการ Endocytosis หรือทำงานร่วมกับ MHC class I ของ Antigen Presenting Cell นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในขบวนการกระตุ้น Inflammatory cytokines, Chemokines และยังเป็น Co-stimulatory molecule โดยผ่านทางขบวนการ $\text{NF-}\kappa\text{B}$ signaling pathway และยังพบว่า HSP จะถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยจะถูกควบคุมโดยโปรตีนบางตัวที่อยู่บนผิวเซลล์บางชนิด ในสภาพที่เซลล์หรือเนื้อเยื่อเกิด Neutrotic cell death ซึ่งอาจใช้เป็นสัญญาณบ่งบอกให้ทราบถึงสภาพของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ภายใต้สภาวะอันตรายต่าง ๆ

ในการทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ HSP70 เป็นตัวแทนของการศึกษาการสร้าง Stress protein ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอาจกล่าวได้ว่า HSP70 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ HSP อื่น ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า นับตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง กุ้งทดลองในทุก ๆ กลุ่มมีการสร้าง HSP ออกมาน้อยมาก โดยพบว่าการแสดงออกมาในบางช่วงเวลาเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง ไม่ได้มีสภาพแวดล้อมหรือตัวกระตุ้นใดเกิดขึ้นจนมีผลให้กุ้งทดลองเกิดความเครียดแล้วทำให้กุ้งในทุกกลุ่มมีการเกิดสภาวะความเครียดขึ้น และยังแสดงให้เห็นว่า กุ้งทดลองที่ได้รับเบต้า-กลูแคน ตั้งแต่ระดับ 1 กรัม ไปจนถึง ความเข้มข้นในอัตรา 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน ไม่ได้ทำให้กุ้งทดลองเกิดความเครียดในระดับวิกฤตขึ้นหรือมีการแสดงออกของยีน HSP70 เพิ่มมากขึ้นแต่อย่างใด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lo *et al.* (2004) ที่ได้รายงานไว้ว่า HSP70 ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำนั้นจะมีการแสดงออกที่เบาบางมาก เมื่อกุ้งอยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต แต่จะมีการแสดงออกมาอย่างรวดเร็วในปริมาณมาก ๆ เมื่อกุ้งอยู่ในสภาพที่ได้รับความร้อนหรือได้รับตัวก่อความเครียดอื่น ๆ

Yamuna *et al.* (2000) ได้รายงานการศึกษาผลของโลหะหนักต่อลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่สัมผัสกับ Hg และ Cu เป็นเวลา 1, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ HSP70 เป็นตัวชี้วัดในส่วนของเหงือก ตับและตับอ่อน พบว่าปริมาณของ HSP70 ในเหงือก ตับและตับอ่อนเมื่อใช้ Anti-HSP70 ตรวจสอบ จะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในช่วง 1 ถึง 16 ชั่วโมง และ 1 ถึง 24 ชั่วโมง ภายหลังการสัมผัสกับ Hg และ Cu ตามลำดับ แต่ภายหลังจาก 48 ชั่วโมงภายหลังการสัมผัสแล้วจะไม่สามารถตรวจพบปริมาณ HSP70 ได้

Liu *et al.* (2004) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ HSP70 ในกุ้งก้ามกรามโดยวิธี Northern blotting และ Semi-quantitative RT-PCR แสดงให้เห็นว่า HSP70 จะมีการแสดงออกมาในปริมาณมากภายใต้อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ในเนื้อเยื่อทุกชนิด ขณะที่ HSP70 cognate (HSC70) นั้นมีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อยกเว้นกล้ามเนื้อ ส่วนการตอบสนองต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในกล้ามเนื้อเท่านั้น

Cellura *et al.* (2006) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 ในกล้ามเนื้อและเซลล์เม็ดเลือดของหอยแมลงภู่มิ *Mytilus galloprovincialis* ภายหลังกระตุ้นด้วยการใช้ความร้อนในระดับที่ไม่รุนแรง และแบคทีเรียที่ทำให้ตายแล้ว รวมถึงการใช้ตัวก่อความเครียดอื่น ๆ โดยใช้วิธี Quantitative RT-PCR และใช้ House keeping gene คือ 28S rRNA เป็นยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HSP70 พบว่าในเม็ดเลือดของหอยที่ถูกกระตุ้นด้วยการแช่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 90 นาที แล้วนำกลับมาแช่ที่ 20 องศาเซลเซียส ในน้ำเค็ม, การฉีดด้วย Heat-killed Gram-negative bacteria *V. splendidus* LGP32, การฉีดด้วย Heat-killed Gram-negative bacteria *V. anguillarum*, และการฉีดด้วย Heat-killed Gram-positive bacteria *Micrococcus lysodeikticus* พบว่าสัดส่วนของการแสดงออกของ HSP70 และยีน 28S rRNA มีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดประมาณ 5.2 เท่า ที่ 6 ชั่วโมง ภายหลังการทำ Heat shock และสูงสุดที่ 15 ชั่วโมง และยังมีการแสดงออกอย่างต่อเนื่องจนถึง ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งให้ผลคล้ายกับฉีดด้วย *V. anguillarum* ที่การแสดงออกของยีน HSP70 เริ่มเพิ่มมากขึ้นที่ ชั่วโมงที่ 12 และเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และกลับสู่ปรกติที่ 72 ชั่วโมง ตรงข้ามกับที่ฉีดด้วยเชื้อ *V. splendidus* หรือ *M. lysodeikticus* ที่ไม่สามารถโน้มนำให้เกิดการแสดงออกของยีน HSP70 ได้ภายในสามวันแรกของการได้รับเชื้อ

2.2 Serine Proteinase Inhibitor

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน SPI มีการแสดงออกมากในกึ่งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ 1 และ 3 ภายหลังจากการได้รับอาหารทดลอง อย่างไรก็ตาม ณ ช่วงเวลาอื่น ๆ นั้น กลับไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของยีนชนิดนี้ในกึ่งทุกกลุ่มในวันอื่น ๆ ของการตรวจสอบ โดยพบว่ามี การขึ้นลงในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน SPI จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งในกลุ่ม serpin ที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ (Potempa *et al.*, 1994) โดยในสัตว์นั้นจะสามารถพบได้ในน้ำเลือดและสามารถจัดเป็นกลุ่มได้กว่า 10 Families ใหญ่ โดยในแมลงและ Arthropods นั้น จะถูกจัดเป็น 4 กลุ่มคือ Kazal type, Kunitz type, α -macroglobulin และ Serpin โดยส่วนใหญ่จะทำหน้าที่สำคัญในการปกป้องตัวสัตว์จากเชื้อโรคหรือพาราไซต์ โดยทำหน้าที่ในกลไกสำคัญ ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะการควบคุมและจำกัดการทำงานของเอนไซม์ในจุลชีพ เช่น การต้านทานต่อ Microbial proteinases ของจุลชีพ ควบคุมการทำงานของ Endogenous proteinase เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Haemolymph coagulation, PO activation, ควบคุมการทำงานของ SP ชนิดอื่น ๆ ในน้ำเลือด ทำหน้าที่ในการเป็น Proteolytic activation ของ Cytokines เป็นต้น (Kanost, 1999) สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhu *et al.* (2006) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน SPI ใน bay scallops (*Argopecten irradians*) ด้วยวิธี RT-PCR ภายหลังจากการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* พบว่ามีการแสดงออกในน้ำเลือดมากขึ้นสูงสุดที่ 6 และ 8 ชั่วโมง ภายหลังจากการติดเชื้อ แสดงให้เห็นว่า SPI มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Lanz *et al.* (1993) ที่ศึกษา ProPO system ใน crayfish (*Procambarus clarki*) พบว่า SP สามารถกระตุ้นระบบ ProPO system ได้

Jarasrassamee *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษา Kazal-Type SPIs ในกึ่งกุลาคำ พบว่า Recombinant SPIs ที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ SP ได้หลายชนิดและมีระดับการยับยั้งแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin, Chymotrypsin และ Subtilisin ได้ถึง 89%, 70% และ 8% ตามลำดับ แต่ก็ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Elastase ได้ และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot พบว่า SPI มีขนาด 1.6 และ 1.7 Kb ไม่พบการแสดงออกในเนื้อเยื่อเมื่อตรวจด้วย RT-PCR แสดงให้เห็นว่า SPI ชนิดนี้ มีความเจาะจงในการแสดงออกเฉพาะในเม็ดเลือดของกึ่งกุลาคำเท่านั้น ซึ่งให้ผลคล้ายกับการรายงานของ Somprasong *et al.*, (2006) ซึ่งได้รายงานผลการศึกษา Kazal-type SPIs ชนิดหนึ่งในเม็ดเลือดของกึ่งกุลาคำ พบว่า Recombinant protein (rSPIpm2) ชนิดดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Sbttilisin และ

Elastase ได้เป็นอย่างดี ส่วน Trypsin นั้นสามารถยับยั้งได้บ้าง ขณะที่ Chymotrypsin นั้น เป็น เอนไซม์ที่ SPI ชนิดนี้ไม่สามารถยับยั้งการทำงานได้

2.3 Peroxinectin

ยีน Peroxinectin ถูกค้นพบครั้งแรกใน Freshwater crayfish โดยทั่วไปแล้ว เป็น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบ ProPO ในกลุ่มของสัตว์ Invertebrates จะถูกสังเคราะห์ขึ้นและเก็บไว้ อยู่ใน Granule ของเซลล์เม็ดเลือดชนิด Granulocytes และ Semi-granulocytes ในรูป Inactive จะถูกหลั่งออกมาเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยองค์ประกอบของจุลชีพ ซึ่งหน้าที่ของยีนชนิดนี้ จัดได้ว่าเป็นยีนที่มีหน้าที่หลากหลาย (Multifunction protein) เช่น ทำหน้าที่สำคัญเป็น Cell adhesion เกี่ยวกับขบวนการเกิด Degranulation, การกระตุ้นให้เกิดขบวนการ Encapsulation, Opsonin และ PO activity โดยเฉพาะในการกระตุ้นระบบ ProPO เมื่อมีเชื้อโรคหรือ สิ่งแปลกปลอมเข้ามาในร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดจะทำหน้าที่จดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ดังกล่าวแบบไม่จำเพาะเจาะจง และเปลี่ยนรูปจาก Non-adhesive cell เป็น Adhesive cell เพื่อจับกับ สิ่งแปลกปลอม ดังนั้น Peroxinectin จึงมีส่วนสำคัญในการตอบสนองจับกับสิ่งแปลกปลอมของ ขบวนการ Encapsulation (Johansson *et al.*, 1995)

Holmblad and Soderhall (1999) ได้ทำการศึกษาโปรตีนชนิดหนึ่งในน้ำเลือดของ Crayfish ซึ่งอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ Cell adhesion ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการเข้าสู่ขบวนการ Phagocytosis และ Encapsulation และได้ตั้งชื่อโปรตีนนั้นว่า Peroxinectin ซึ่งสามารถพบได้ใน เซลล์เม็ดเลือดชนิด Semi-granular และ Granular cells และจะมีการหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เมื่อ ได้รับการกระตุ้นจาก ProPO ซึ่ง Peroxinectin สามารถจับกับ โปรตีน SOD ขนาด 90 kDa ที่อยู่บน ผิวเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด Crayfish และทั่วไปแล้วจะทำหน้าที่เป็นตัวรับการเกิด Cell adhesion ภายหลังจากการหลั่งออกมาเมื่อถูกกระตุ้น Peroxinectin อาจเกิด Opsonize กับสิ่งแปลกปลอมที่ถูก จดจำโดย Integrins ที่ผิวเซลล์ของเม็ดเลือด

Sritunyalucksana *et al.* (2001) ได้ศึกษาการกระตุ้น ProPO activating system ในกุ้งกุลาดำ โดยการทดลอง Cell adhesion assay และได้แสดงให้เห็นว่า Granular cells จำนวนมาก (60%) สามารถเกาะติดกับผิว Cover slips กับ Haemocyte lysate supernatant ของกุ้งได้ ขณะที่ที่มีจำนวน น้อย สามารถเกาะติดกับผิว Cover slips กับ Bovine serum albumin จากการศึกษาลำดับเบสของ

โปรตีนชนิดนี้ของกุ้งพบว่าคล้ายกับ Peroxinectin ของ Crayfish คล้ายกับ Peroxidases และ Putative peroxidases จากสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ซึ่ง Peroxinectin ของกุ้งมีความคล้ายคลึงกับ Peroxinectin-related protein และ Peroxidasein ของ *Drosophila* โดยมีโครงสร้าง Extracellular matrix protein ที่ใช้ในการจับกับ Active peroxidase domain เช่นเดียวกับโครงสร้างของ Immunoglobulin domains และยังสามารถพบ Leucine rich repeats และ Procollagen-like motif ได้อีกด้วย เมื่อทำการศึกษาโดยวิธี Northern blot analysis โดยใช้ Non-peroxidase region ใน Peroxinectin เป็น Probe แสดงให้เห็นว่า Peroxinectin สามารถแสดงออกในเม็ดเลือดกุ้งและลดระดับการแสดงออกลงอย่างมีนัยสำคัญในกุ้งที่ฉีดด้วยเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จาก laminarin ภายใน 1-12 ชั่วโมงภายหลังการฉีด

Liu *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Peroxinectin ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) พบว่า การแสดงออกของยีน Peroxinectin จะลดลงเมื่อกุ้งอยู่ที่อุณหภูมิสูง 34 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่อยู่ 18 องศาเซลเซียส และกลุ่มควบคุมที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส แต่พบว่าการแสดงออกของยีน Peroxinectin ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อนฉีด Zymosan ภายหลังจาก 24 ชั่วโมง

Liu *et al.* (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Peroxinectin ในกุ้งขาว โดยศึกษาด้วยวิธี *in situ* hybridization ทำให้พบว่า Peroxinectin จะสังเคราะห์จาก Granular cells และ Semi-granular cells แต่ไม่พบใน Hyaline cells โดย Peroxinectin จะเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่เม็ดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากการฉีดเชื้อด้วย *V. alginolyticus* เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง และเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดด้วยน้ำเกลือ จากการศึกษาการแสดงออกด้วยวิธี RT-PCR assay แสดงให้เห็นว่า Peroxinectin พบในสัตว์หลายชนิดใน Decapod crustaceans รวมทั้ง *L. vannamei*, Freshwater prawn, Common caridina, Stone crab และ Mud crab จึงได้ข้อสรุปว่า โปรตีนนี้ควรมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean ในการต้านทานต่อเชื้อโรค

Hsu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาผลของการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus garvieae* ที่มีชีวิต ต่อการแสดงออกของยีน Peroxinectin ในกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี Quantitative Real-time PCR พบว่าภายหลังการฉีดด้วยเชื้อดังกล่าว ปริมาณการแสดงออกของ Peroxinectin จะลดลงในชั่วโมงที่ 3, 6 และ 12 ภายหลังการได้รับเชื้อ ส่วนการฉีดด้วยน้ำเกลือและเชื้อแบคทีเรีย *L. garvieae* ที่ทำให้

ตายแล้วจะทำให้ขึ้น Peroxinectin มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมงภายหลังการฉีด ขณะที่การตรวจสอบการแสดงออกด้วยวิธี RT-PCR ยังพบว่า Peroxinectin เป็นอินที่มีการแสดงออกในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งเท่านั้น

2.4 Transglutaminase

ใน Crustacean เอนไซม์ TGase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับขบวนการแข็งตัวของเลือดเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดออกจากร่างกายและป้องกันไม่ให้เชื้อโรคจากภายนอกเข้าสู่ร่างกายในกรณีของการเกิดบาดแผล โดยจะเกิดขึ้นเมื่อ TGase ถูกหลั่งออกมาจากเม็ดเลือดหรือเนื้อเยื่อ โดย Ca^{2+} -dependent TGase จะกระตุ้นให้เกิด Polymerization กับ Clottable protein ใน plasma เกิดเป็นเจลแข็งตัวในที่สุด Iwanaga *et al.* (1998) ได้รายงานว่าการแสดงออกของ TGase นั้น สามารถกระตุ้นด้วยองค์ประกอบของผนังเซลล์ของจุลชีพ ทั้ง ไกลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ จะสามารถพบการแสดงออกของ TGase ที่สูงกว่าในกลุ่มของกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในวันที่ 1 และ 14 เท่านั้น

Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดในกุ้งกุลาดำ โดยแยก Clottable protein จากน้ำเลือดโดย Sequential DEAE anion-exchange chromatography ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมี Ca^{2+} และ TGase ที่ปล่อยออกมาจากเม็ดเลือด ซึ่งสามารถทนความร้อนได้ถึง 66 องศาเซลเซียส จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า Clottable protein มีขนาด 380 kDa โดยการแยกด้วย SDS-PAGE และ MALDI-TOF mass spectrometry ซึ่งพบว่ามีโครงสร้างของอะมิโนแอซิดและขนาดของโปรตีนคล้ายกับที่พบในกุ้งชนิดอื่น ๆ ทั้ง Prawns, Lobster และ Crayfish ด้วย

Wang *et al.* (2001) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือด ใน Crayfish พบว่า ในเม็ดเลือดทั้งชนิด Semi-granular และ Granular รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของ เอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน ตับและตับอ่อน และ Plasma และเมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของนิวคลีโอไทด์พบว่า TGase ของ Crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Huang *et al.* (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของ TGase ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีความคล้ายกับใน Crayfish สัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ และสามารถตรวจพบได้ในทุก

อวัยวะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกมาในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อส่วน Hematopoietic tissue อีกด้วย

Chen *et al.* (2005) ได้ค้นพบยีน TGase ชนิดใหม่ในกุ้งกุลาดำ โดยให้ชื่อว่า Transglutaminase II (STG II) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่ายีนชนิดนี้มีการแสดงออกในเม็ดเลือด แต่ไม่แสดงออกในตับและตับอ่อน ซึ่งตรงข้ามกับ STG I ซึ่งหน้าที่ของ STG II นั้นพบว่าทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้ Clottable Protein เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวเมื่อสังเกตร่างกายได้กล้อง Transmission electron microscopy (TEM) ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อสรุปว่า STG II มีคุณสมบัติเหมือน TGase ของเม็ดเลือด ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด นอกจากนี้ Yeh *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ TGase 2 ชนิดต่อการแข็งตัวของเลือดในกุ้งกุลาดำ พบว่า ทั้ง STG I และ STG II มีคุณสมบัติในการทำให้เลือดของกุ้งแข็งตัวได้อย่างชัดเจนเมื่อทำการทดสอบในหลอดทดลอง

2.5 Lysozyme

Lysozyme จัดเป็น AMP ชนิดหนึ่ง ที่สามารถพบได้ทั้งใน Eukaryotes และ Prokaryotes สามารถกระตุ้นให้เกิดขบวนการ Hydrolysis ของผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ และจัดเป็น Humoral immunity ทำหน้าที่ต้านทานการบุกรุกของแบคทีเรียแบบไม่เจาะจง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสามารถจำแนกได้เป็น 6 ชนิด ได้แก่ C-type, G-type, Plant Lysozyme, Phage lysozyme, I-type, Bacteria-lysozyme (Hikima *et al.*, 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่เริ่มต้นการทดลองกุ้งในทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน Lysozyme ในเม็ดเลือดในปริมาณที่สูงแสดงให้เห็นถึงความสำคัญในการปกป้องร่างกายของกุ้งในระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตามภายหลังจากการได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารแล้วเป็นเวลา 3 และ 10 วัน เป็นช่วงที่สามารถเห็นความแตกต่างในการแสดงออกเด่นชัดที่สุด โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารจะมีการแสดงออกของยีน Lysozyme แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Paulsen *et al.* (2001) ที่ได้ทดลองใช้เบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการสร้าง Lysozyme ของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) และพบว่าปริมาณของ Lysozyme ในปลากลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนจะเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 3 เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 6 เท่าในวันที่ 6 ของการได้รับเบต้า-กลูแคน

Noga *et al.* (1996) รายงานผลการศึกษาศาสตร์ในน้ำเลือดของ *Callinectes sapidus* possesses ซึ่งสามารถทำให้เกิด Bactericidal activity มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *A. hydrophila*, *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus* และ *V. vulnificus* รวมถึงแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ของ *E. coli* ด้วย ซึ่งกิจกรรมที่เกิดขึ้นนั้นน่าจะมีผลมาจากการทำงานของ Lysozyme

Sotelo-Mundo *et al.* (2003) ได้ศึกษากิจกรรมของ Lysozyme ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) โดยตรวจสอบกิจกรรมของ Lysozyme ในเม็ดเลือดกุ้งด้วยวิธี Lytic-zone assay ต่อเชื้อ *Micrococcus luteus* พบว่า Lysozyme จากกุ้งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังสามารถแสดงให้เห็นว่า Lysozyme ในกุ้งขาวเป็นชนิด C-type ยิ่งไปกว่านั้น ลำดับเบสของ Lysozyme ยังประกอบด้วย Extra residues ที่ C-terminus ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของ Marine invertebrates อีกด้วย

Hikima *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษากิจกรรมของ Lysozyme จากเม็ดเลือดกุ้ง *M. japonicus* ซึ่งเป็น C-type พบว่า Lysozyme จากเม็ดเลือดกุ้ง *M. japonicus* มีความเหมือนของลำดับ Amino acid คล้ายกับ Pacific white shrimp ถึง 79.7% และคล้ายกับในแมลงและสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ประมาณ 33.3 - 43.0% จากการวิเคราะห์ Phylogenetic พบว่า Lysozyme ของกุ้ง *M. japonicus* มีความใกล้เคียงกับ Vertebrate C-type lysozymes และยังพบว่าในกุ้ง Kuruma shrimp ยีน Lysozyme ยังแสดงหน้าที่เป็น Lytic activities ด้านทานเชื้อ *Vibrio* หลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรคในกุ้งและโรคปลารวมทั้ง *V. penaeicida* และยังชี้ให้เห็นชัดเจนว่า Lysozyme ของกุ้งมีผลต่อการต้านทานเชื้อโรคหลายชนิดอีกด้วย

Enrique *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของ Lysozyme ต่อการทำลายเชื้อโรค โดยวัดกระบวนการ Antibacterial activity โดยวิธี Turbidimetric assay กับแบคทีเรียที่มีชีวิต ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) พบว่า Lysozyme ในกุ้งขาว สามารถต้านทานต่อแบคทีเรียแกรมลบสามชนิด คือ *V. alginolyticus*, *V. parahemolyticus* และ *V. cholerae* ซึ่งนอกจากนี้ยังพบว่า Antibacterial activity ของ Lysozyme ยังสามารถต้านทานต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *M. luteus* ได้ดีเช่นกัน

2.6 β -Glucan Binding Protein

โปรตีนชนิดนี้จัดเป็น PRPs ชนิดหนึ่ง สามารถจับกับโครงสร้างที่เป็น เบต้า-กลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของยีสต์และเชื้อรา และยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบ ProPO โดยเกาะอยู่ที่ผิวเซลล์เม็ดเลือดและจะทำให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ Degranulation และ ProPO activating system ซึ่งเป็นระบบที่มีความสามารถสูงในการต้านจุลชีพ รวมถึงกระบวนการเกิด Melanization, Phagocytosis, Encapsulation และ Nodule formation นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเป็น Opsonins ในกระบวนการ Phagocytosis และจัดเป็นโปรตีน ที่มีน้ำหนักประมาณ 100 kDa

Vargas-Albores *et al.* (1997) ได้ศึกษายีน β GBP ในน้ำเลือดกุ้ง *L. vannamei* และ *P. stylirostris* มีขนาด 100 kDa คล้ายกับ β GBP ในกลุ่มของครัสเตเชียนชนิดอื่น ซึ่งเมื่อตรวจสอบด้วย Antisera พบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกับ β GBP ของ *P. californiensis* และ *Pacifastacus leniusculus* และยังได้ข้อสรุปที่สำคัญว่ายีนนี้สามารถพบได้ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนทั้งที่อาศัยในน้ำเค็มและน้ำจืดอีกด้วย (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ได้รายงานว่ายีนในกลุ่มครัสเตเชียนมีกลไกจดจำต่อสิ่งแปลกปลอมพวกแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน โดยองค์ประกอบของจุลชีพสามารถกระตุ้นการป้องกันตัวโดยเซลล์โดยตรง เช่น Phagocytosis, Melanization, Encapsulation และ Coagulation โปรตีนที่จำเพาะเจาะจงในน้ำเลือดจะถูกกระตุ้นเพิ่มมากขึ้น โดย β GBP ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเบต้า-กลูแคน เกิดเป็น Glucan- β GBP complex เป็นผลทำให้เกิดกระบวนการ Degranulation และกระตุ้น ProPO ตามมา

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lee and Soderhall (2001) ได้ศึกษา PRP ชนิดหนึ่งในเม็ดเลือดของ Freshwater crayfish ชื่อว่า Masquerade-like protein พบว่ามีความสามารถจับกับ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ กลูแคน แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ นอกจากนี้ *E. coli* ที่เคลือบด้วย Masquerade-like protein สามารถกำจัดไปจากตัว crayfish อย่างรวดเร็ว ดังนั้นโปรตีนนี้จึงทำหน้าที่เป็น Opsonin ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อเริ่มการทดลอง β GBP เป็นยีนที่มีการแสดงออกน้อยมาก แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าภายหลังให้อาหารทดลองเป็นเวลา 1 วัน กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 1 และ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกของยีน β GBP อย่างชัดเจน ส่วนในวันที่ 14 ของการทดลอง ถึงแม้ว่าจะสามารถเห็นการแสดงออกของยีน β GBP ของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคน

แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่การแสดงออกก็ไม่ได้หนาแน่น โดยจะสังเกตเห็นได้เฉพาะแถบบาง ๆ เท่านั้น ซึ่ง Sritunyalucksana *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษา β GBP จากกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี Northern blot analysis แสดงให้เห็นว่ายีนชนิดนี้มีการแสดงออกในเม็ดเลือดเป็นหลัก และยังพบว่าภายหลังการฉีดด้วย Curdlan หรือ Heat-killed bacterial cell ของ *V. harveyi* พบว่าไม่มีนัยสำคัญในการแสดงออกของยีน β GBP ภายใน 12 ชั่วโมงหลังการฉีด และเมื่อบ่ม Hemocyte Lysate Supernatant (HLS) ของกุ้งด้วย Curdlan หรือ Zymosan สามารถแยกโปรตีนขนาด 31 kDa ด้วยวิธี Immunoblotting ซึ่งโปรตีนนี้สามารถตรวจพบโดย Affinity-purified anti-crayfish LGBP antibody ในทางตรงข้ามและเมื่อบ่ม HLS ของกุ้งด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ไม่สามารถตรวจพบด้วย SDS-PAGE หรือ Immunoblotting แสดงให้เห็นว่าสารเหล่านี้จะมีการจับอย่างจำเพาะกับเบต้า-กลูแคน อย่างไรก็ตาม Roux *et al.* (2002) ได้รายงานผลการศึกษา PRPs ในกุ้ง *P. stylirostris* ที่ติดเชื้อ White spot virus โดยใช้วิธี Real-time Quantitative RT-PCR แสดงให้เห็นว่ายีน β GBP มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในช่วงแรก ๆ ของการติดเชื้อและเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่กุ้งติดเชื้อ ขณะที่ยีน ProPO มีการแสดงออกมากในช่วงแรกของการติดเชื้อเท่านั้น ซึ่งเมื่อระยะเวลาผ่านไป การแสดงออกของยีน ProPO ยิ่งลดลงมากเท่านั้น การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า PRPs เป็นยีนที่เกี่ยวข้องและทำหน้าที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการติดเชื้อไวรัส WSSV เช่นเดียวกับกับรายงานของ Su *et al.* (2004) ที่พบว่า β GBP ใน หอยเชลล์ *Chlamys farreri* จะมีการแสดงออกมากในช่วงแรกเมื่อทำการฉีดสัตว์ทดลองด้วยเชื้อ *V. anguillarum* แสดงให้เห็นว่า β GBP ในหอยเชลล์ จะมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคในระยะเฉียบพลันในช่วงแรกของการติดเชื้อ สอดคล้องกับการศึกษาของ Cheng *et al.* (2005) ที่ได้ทำการศึกษารายการแสดงออกของยีน LGBP จากเม็ดเลือด และตับและตับอ่อน ของกุ้งขาว ด้วยวิธี Quantitative Real-time RT-PCR แสดงให้เห็นว่า LGBP จากเม็ดเลือดกุ้ง *L. vannamei* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในชั่วโมงที่ 3 และ 6 หลังจากการฉีดด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. alginolyticus*

2.7 Prophenoloxidase

ยีนชนิดนี้จัดเป็นยีนที่มีความสำคัญอย่างมากในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่มไม่มีกระดูกสันหลังทั้งแมลง กุ้ง และปู เนื่องจากเป็นกลไกที่สัตว์ในกลุ่มนี้ใช้ในการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม โดยเป็นผลให้เกิดสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น Melanin หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า Melanization นั่นเอง กระบวนการนี้รู้จักกันดีว่าเป็นปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ในกลุ่ม Crustacean เกิดขึ้นในลักษณะที่เป็น Enzymatic cascade โดยการ

กระตุ้นการทำงานของ Pro enzyme ที่เรียกว่า ProPO ที่อยู่ในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ (Inactive form) ให้เป็นเอนไซม์ในรูปที่พร้อมจะทำงาน (Active form) ในรูป PO สามารถ Oxidize phenol ให้เป็น Quinones เกิด Polymerize เป็น Melanin ในที่สุด ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของ Melanin นอกจากจะสามารถฆ่าเชื้อโรคได้แล้วยังมีคุณสมบัติที่เหนียวสามารถยึดจับหรือปกคลุมไม่ให้เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสามารถเคลื่อนตัวไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ Gollas-Galvan *et al.* (1999) ได้ศึกษา ProPO ในกุ้ง *P. californiensis* พบว่าโปรตีนนี้สามารถถูก Hydrolyzed โดยเอนไซม์ Proteinases แล้วจึงเปลี่ยนรูปเป็น PO หรือ Tyrosinase-like phenoloxidase จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า ProPO ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์ไม่สามารถถูกกระตุ้นได้โดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ หรือ เบต้า-กลูแคนในสภาพหลอดทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันได้เป็นอย่างดีว่าการใช้เบต้า-กลูแคนสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำให้มีการแสดงออกของยีน ProPO ได้สูงขึ้น โดยพบว่า กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนเกือบทุกกลุ่มการทดลองมีการแสดงออกของยีน ProPO มากกว่ากลุ่มควบคุมในทุก ๆ วันทำการตรวจสอบ ยกเว้นในวันที่ 10 ที่ปริมาณการแสดงออกของกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคน มีระดับการแสดงออกที่เบาบางกว่ากลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการทดลองของ Hernandez-Lopez (1996) ซึ่งรายงานว่ PO activity จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย เบต้า-กลูแคนในรูปของ Laminarin ในอัตราที่สูงขึ้นเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดของ Brown shrimp ด้วย Laminarin โดยใช้ความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.01-10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ Laminarin 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะมีการแสดงออกของ PO activity สูงที่สุด

Okumura (2007) ได้ศึกษาผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีน Penaeidins, Crustin, SP และ ProPO ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) โดยการฉีดด้วยความเข้มข้นต่างกัน ด้วยวิธี Real-time RT-PCR พบว่าภายหลังการฉีดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์แล้ว การแสดงออกของยีน AMPs, Penaeidin 2, Penaeidin 3, Penaeidin 4 และ Crustin มีการแสดงออกลดลงอย่างรวดเร็ว และแปรผันตรงตามระดับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการฉีดกระตุ้นแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจะกลับเข้าสู่ระดับการแสดงออกปกติภายใน 72 ชั่วโมง โดยที่ระดับการแสดงออกของยีน SP และ ProPO ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่ายีนในกลุ่ม AMP มีการตอบสนองต่อการฉีดกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ขณะที่ยีนในกลุ่ม ProPO system ไม่มีการตอบสนองจากการฉีดกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

Lai *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ProPO ในกุ้งขาว โดยวิธี RT-PCR พบว่ายีน ProPO ในกุ้งขาวสามารถตรวจพบได้ในเม็ดเลือดแต่ไม่พบในตับและตับอ่อน หรือ กล้ามเนื้อ โดยยีน ProPO ของกุ้งขาวมีการตอบสนองต่อ Exogenous protease (trypsin), Detergent (Sodium dodecyl sulphate), Algale และองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลชีพ ได้แก่ Laminarin, Sodium alginate, Zymosan และ โลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่ง ProPO จะไวต่อ Proteinase inhibitors นอกจากนี้ในเม็ดเลือดแล้ว Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษาการแพร่กระจายของยีน ProPO ในกุ้งขาว ด้วยวิธี Northern blot แสดงให้เห็นว่า ProPO สร้างมาจากเม็ดเลือดเป็นหลัก และเมื่อตรวจสอบด้วย เทคนิค RT-PCR พบว่ายีน ProPO มีการแพร่กระจายใน เม็ดเลือด, เหงือก, หัวใจ, Lymphoid organ, กระเพาะอาหาร, ลำไส้, Anterior midgut caecum และ Ganglion และแสดงออกน้อยในส่วนของ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ และ Cuticular epidermis และจากการตรวจสอบโดยเทคนิค *in situ* hybridization ยังแสดงให้เห็นว่า เหงือก หัวใจ กล้ามเนื้อ, Haematopoietic tissue, ตับและตับอ่อน เป็นส่วนที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน ProPO ได้เช่นกัน เช่นเดียวกับ F และ E cell ของ ตับและตับอ่อน

Hauton *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ รวมทั้ง การใช้เบต้า-กลูแคนในระดับ 0.025% ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ProPO และ β GBP ใน เม็ดเลือดของกุ้ง Lobster (*Homorus gammarus*) ในหลอดทดลอง โดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่าเบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ *S. cerevisiae* รวมทั้งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ไม่สามารถ กระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดชนิด Granulocytes ให้เพิ่มการแสดงออกของยีน ProPO และ β GBP ได้ ในสภาพของเซลล์ที่เลี้ยงในหลอดทดลองภายในเวลาสั้น ๆ ที่ 24 ชั่วโมงได้

Hauton *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสองชนิดคือเบต้า-กลูแคน และ Alginate โดยการแช่กุ้งทดลอง European lobster (*H. gammarus*) น้ำหนักประมาณ 0.15 กรัม โดยแบ่งเป็นสองชุดการทดลองคือ การแช่เพียงครั้งเดียวประมาณ 3 ชั่วโมง และทำการแช่ซ้ำทุก ๆ 7 วัน จนครบวันที่ 35 จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ProPO, β GBP และ AMP ด้วย เทคนิค Real-time PCR พบว่า ภายหลังจากแช่ครั้งเดียวที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีนทั้งสาม ชนิดไม่ได้เพิ่มการแสดงออกแต่อย่างใด แต่พบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญบ้างของยีน β GBP ระหว่างการแช่ด้วย β GBP และ Alginate และยังพบว่า การแช่ซ้ำในทุก ๆ 7 วัน ไม่สามารถกระตุ้นให้ยีนทั้งสามชนิดนี้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นได้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในกุ้งที่ แข็งแรงไม่ว่าจะเป็นกุ้งในกลุ่มควบคุมหรือได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือไม่ก็ตามจะมีการ

แสดงออกของยีน AMP สูงกว่า ProPO และ β GBP อย่างชัดเจน นอกจากนี้การทดสอบความคุ้ม
โรคในกุ้งทดลองด้วยเชื้อแบคทีเรียชนิด *Listonella anguillarum* และ *Aerococcus viridans* พบว่าไม่
ว่าการใช้เบต้า-กลูแคนหรือ Alginate ก็ไม่สามารถเพิ่มอัตราการรอดตายของกุ้งกลุ่มดังกล่าวให้
สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมได้

2.8 Antimicrobial peptide, Penaeidin และ Crustin

Antimicrobial peptide (AMPs) สามารถจำแนกได้หลายชนิดพบได้ทั้งในสัตว์มี
กระดูกสันหลัง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และพืช เป็น Small peptide มีขนาดประมาณ 150-200
กรดอะมิโน น้ำหนัก 10 kDa จากการศึกษาหน้าที่ของ AMPs ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสัตว์ไม่มี
กระดูกสันหลังบางชนิด แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ของ AMPs หลายอย่าง เช่นการควบคุม
Transcriptional, Translational, Subcellular localization, Post-translational modification และ
Secretion regulation โดยสามารถจำแนก AMPs ออกเป็น 4 ชนิดตามโครงสร้าง คือ 1) Linear
peptides, forming α -helices and lacking in cysteine residues 2) Cystein-rich peptides with
intramolecular disulfide bridge, forming hairpin-like β -sheet or α -helical- β -sheet mixed
structure 3) Proline-rich peptides 4) Glycine-rich peptides (Bartlett *et al.*, 2002)

ในกลุ่มของ Penaeid shrimps นั้น AMPs ที่มีการศึกษาและได้ทำการจำแนกแล้วได้แก่
Penaeidin และ Crustin โดย Penaeidin นั้น พบครั้งแรกในกุ้ง *L. vannamei* มีขนาดประมาณ 5.5-6.6
kDa มีหลาย Isoforms ได้แก่ Penaeidin 1, 2, 3 และ 4 มีคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรียแกรม
บวก เชื้อรา รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด ส่วน Crustin นั้น ถูกพบครั้งแรกใน ปู *Carcinus
maenas* และมีโครงสร้างเป็น Cystein-rich ขนาดประมาณ 11.5 kDa มีคุณสมบัติในการยับยั้ง
แบคทีเรียแกรมบวกเป็นหลัก

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของเบต้า-กลูแคนต่อการแสดงออกของ ทั้ง Penaeidin
และ Crustin รวมทั้ง AMP ที่ยังไม่ทราบกลุ่มอีกหนึ่งชนิดพบว่า Crustin และ Penaeidin ในกลุ่มที่
ได้รับเบต้า-กลูแคน มีการแสดงออกแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 1 ของ
การได้รับอาหารทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ Penaeidin ในกุ้งกลุ่มที่ได้รับเบต้า-
กลูแคนยังมีการแสดงออกแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอีกครั้งในวันที่ 14 ขณะที่ AMP อีกหนึ่งชนิดนั้น

จะสามารถเห็นความแตกต่างของการแสดงออกในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในวันที่ 7 และ 14 ภายหลังจากให้อาหารเท่านั้น

Rattanachai *et al.* (2004) ได้ศึกษา Crustin-like peptide ในกุ้ง *M. japonicus* จากเม็ดเลือด พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *L. setiferus*, *L. vannamei* และ *C. maenas* ถึง 80%, 80% และ 44% ตามลำดับ จากการตรวจสอบการแสดงออก ด้วยวิธี RT-PCR ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ เม็ดเลือด ตับและตับอ่อน เหงือก ลำไส้ส่วนหน้า ลำไส้ส่วนกลาง กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อได้เปลือก และ รังไข่ พบว่า Crustin ของกุ้งมีการแสดงออกในส่วนเม็ดเลือดเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับการแสดงออกของยีน Crustin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ที่ 1, 3 และ 7 วัน หลังให้อาหารที่ผสมเปปติโดกลัยแคนเมื่อตรวจสอบโดยวิธี Quantitative Real-time PCR

Supungul *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน AMP homologues, Antilipopolysaccharide factors (ALF), Penaeidins และ Crustins ในเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำ ที่ฉีดด้วย *V. harveyi* พบว่ายีน ยีน ALF จะมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ยีน Crustins และ Penaeidins มีการแสดงออกลดลง และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน ALF, Penaeidin และ Crustin โดยวิธี RT-PCR ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ จะพบว่ายีนเหล่านี้จะมีการแสดงออกอยู่ในเม็ดเลือดเป็นหลัก

Vargas-Albores *et al.* (2004) ได้รายงานผลการศึกษายีน Crustin ในกุ้ง *L. vannamei* พบว่า Crustin ของกุ้งชนิดนี้เป็นยีนในกลุ่ม AMP ซึ่งมีขนาดต่างกันและสามารถแบ่งออกเป็น 2 Isoforms (I และ P) โดยจะพบว่าชนิด I จะมีระดับการแสดงออกอยู่ในระดับปรกติแต่ชนิด P จะถูกทำให้มีการแสดงออกลดลงเมื่อได้รับเชื้อ *V. alginolyticus* นอกจากนี้ (Okumura, 2007) ได้ศึกษาผลของไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยการฉีดด้วยความเข้มข้นต่างกันต่อการแสดงออกของยีน Penaeidins, Crustin, SP และ ProPO ในกุ้งขาว (*L. vannamei*) ด้วยวิธี Real-time RT-PCR พบว่าภายหลังการฉีดด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์แล้ว การแสดงออกของยีน AMPs, Penaeidin 2, Penaeidin 3, Penaeidin 4 และ Crustin มีการแสดงออกลดลงอย่างรวดเร็วและแปรผันตรงตามระดับความเข้มข้นของไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการฉีดกระตุ้นแล้วเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วจะกลับเข้าสู่ระดับการแสดงออกปรกติภายใน 72 ชั่วโมง โดยที่ระดับการแสดงออกของยีน SP และ ProPO ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแสดงให้เห็นว่ายีนในกลุ่ม AMP มีการตอบสนองต่อการฉีดกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

Hauton *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสองชนิดคือเบต้า-กลูแคน และ Alginate โดยการแช่กุ้งทดลอง European lobster (*H. gammarus*) ขนาดประมาณ 0.15 กรัม โดยแบ่งเป็นสองชุดการทดลองคือ การแช่เพียงครั้งเดียวประมาณ 3 ชั่วโมง และทำการแช่ซ้ำทุก ๆ 7 วัน จนครบวันที่ 35 จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของยีน ProPO, β GBP และ AMP ด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่า ภายหลังจากแช่ครั้งเดียวที่ 6 ชั่วโมง การแสดงออกของยีนทั้งสามชนิดไม่ได้เพิ่มการแสดงออกแต่อย่างใด แต่พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญบ้างของยีน β GBP ระหว่างการแช่ระหว่าง β GBP และ Alginate และยังพบว่าการแช่ซ้ำในทุก ๆ 7 วันไม่สามารถกระตุ้นให้ยีนทั้งสามชนิดนี้มีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นได้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในกุ้งที่แข็งแรงไม่ว่าจะเป็นกุ้งในกลุ่มควบคุมหรือได้รับสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือไม่ก็ตามจะมีการแสดงออกของยีน AMP สูงกว่า ProPO และ β GBP อย่างชัดเจน

Destoumieux *et al.* (2000) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Penaeidin ในกุ้งขาว *L. vannamei* ที่ฉีดด้วยเชื้อ *Aerococcus viridans*, *V. alginolyticus* และ *Fusarium oxysporum* บริเวณกล้ามเนื้อปล้องลำตัว พบว่า Penaeidin จะมีการแสดงออกลดลงในระบบเลือดภายหลังจากการฉีดเชื้อ 3 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับ Munoz *et al.* (2002) ได้รายงานผลการศึกษาการแสดงออกของยีนและการแพร่กระจายในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ต่อการต้านทานเชื้อโรค แสดงให้เห็นว่าการหลัง Penaeidin จะถูกควบคุมจากเม็ดเลือดชนิด Large granulocytes โดยจะมีการสร้างออกมาและแพร่กระจายไปตามกระแสเลือดและแทรกในเนื้อเยื่อของกุ้ง โดยมี 2 ขั้นตอนที่เกิดขึ้น คือขั้นแรกเม็ดเลือดเคลื่อนตัวไปที่บริเวณติดเชื้อภายใน 12 ชั่วโมงแรก ไปรวมตัวกันมากขึ้นแล้วหลัง Penaeidin ออกมา ต่อมาเม็ดเลือดในระบบหมุนเวียนเลือดและในเนื้อเยื่อจะเพิ่มการสร้าง Penaeidin ซึ่งอาจจะเกิดการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือด สุดท้ายเมื่อเม็ดเลือดพบกับแบคทีเรียจะทำให้เกิดการทำงานของ Penaeidin โดยจะทำให้เกิดการแตกของเซลล์ของเชื้อโรค นอกจากนี้ยังพบว่า Penaeidin ยังทำหน้าที่จับกับแบคทีเรีย เพื่อกระตุ้นให้เกิด Opsonic activity ในที่สุด และต่อมา Munoz *et al.* (2003) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน Penaeidin ในกุ้งขาวระยะต่าง ๆ คือ Early larval stages (Nauplius V, Zoea I, II, III และ Mysis II) และใน Post-larvae (1 และ 8) โดยวิธี *in situ* hybridization และ Immunohistochemical analyses พบว่า Penaeidin มีการแสดงออกน้อยในช่วง Mysis II แต่จากการวิเคราะห์ด้วย RT-PCR พบว่า Penaeidin พร้อมทั้งจะแสดงออกในช่วง Nauplius V และไม่พบในเซลล์อื่นนอกจากเม็ดเลือด นอกจากนี้ Munoz *et al.* (2004) ได้ศึกษากลไกการต้านทานเชื้อ *V. penaeicida* ของกุ้ง *L. stylirostris* โดยวิธี RT-PCR ในเม็ดเลือดของกุ้ง โดยพบว่ากุ้งที่ติดเชื้อแบคทีเรีย จะมีผลทำให้ Penaeidin ถูกจำกัดให้แสดงออกอยู่ที่เหงือกและ Lymphoid organ อย่างไร

ก็ตามภายหลังการติดเชื้อไปแล้วระยะหนึ่ง กุ้งจะมีการตอบสนองโดยการสร้างเม็ดเลือดออกมาเป็นจำนวนมากแล้วหลัง Penaeidin ออกมากำจัดเชื้อแบคทีเรียในที่สุด

Kang *et al.* (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Penaeidin ในกุ้ง *F. chinensis* ด้วยวิธี RT-PCR และ *in situ* hybridization พบว่า Penaeidin มีการแพร่กระจายในเม็ดเลือด (granular haemocytes), หัวใจ เหงือก ลำไส้ และเนื้อเยื่อได้เปลือก โดยจะพบการแสดงออกในปริมาณมากในเม็ดเลือดเป็นหลัก ขณะที่ Chiou *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียของ Penaeidin ในกุ้งกุลาดำพบว่า Penaeidin-like protein สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก 3 ชนิดคือ *Escherichia coli*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* และ *Aerococcus viridans* และ filamentous fungi 2 ชนิด คือ *F. pisi* และ *F. oxysporum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3. การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงและไวรัสดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงพบว่า ภายหลังจากที่กุ้งได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับต่าง ๆ กันเป็นเวลา 14 วัน แล้วทำการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดกุ้งทดลองด้วยเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่มีชีวิต กุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถต้านทานเชื้อเรืองแสงดีกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นับตั้งแต่วันที่สองของการทดสอบไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง โดยมีอัตราการตายสะสมที่สิ้นสุดการทดลองเป็น $33.0 \pm 0.0\%$ เท่านั้น ขณะที่กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม จะเริ่มมีอัตราการตายสะสมแตกต่างจากกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ในวันที่ 8 จนถึงวันที่ 11 อย่างไรก็ตาม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง อัตราการตายสะสมของกุ้งกลุ่มนี้ก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) กับกุ้งในกลุ่มควบคุมและกุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในอัตรา 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $55.6 \pm 8.6\%$, $72.2 \pm 17.2\%$ และ $61.1 \pm 8.6\%$ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้กุ้งกุลาดำมีการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงได้ดีขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ จัฑชานัน (2549) ที่ทดลองให้อาหารผสมเบต้า-กลูแคนในระดับ 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม โดยประเมินจากองค์ประกอบต่าง ๆ ทางภูมิคุ้มกัน ได้แก่ total haemocytes count, phenoloxidase specific activity และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย

V. harveyi พบว่าเบต้า-กลูแคนที่ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันของ กุ้งขาวได้หลังจากการให้อาหารเป็นเวลา 2 สัปดาห์

นอกจากนี้ Scholz *et al.* (1999) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงกุ้งขาว (*L. vannamei*) ด้วยอาหารต่างกัน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ อาหารผสม 1% ยีสต์ *S. cerevisiae*, อาหารผสม 0.1% เบต้า-กลูแคนที่สกัดได้จาก *S. cerevisiae*, อาหารผสม 1% ยีสต์ *Phaffia rhodozyma*, อาหารผสม 1% Experimental yeast (HPPR1) และอาหารปรกติเป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าไม่มีความแตกต่างของการเจริญเติบโต ในกุ้งที่ได้รับอาหารชนิดต่าง ๆ แต่อัตรารอดของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วย *S. cerevisiae*, *P. rhodozyma* และ yeast สูงกว่าที่เลี้ยงด้วย เบต้า-กลูแคนอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.006$) และสูงกว่าอย่างไม่มี นัยสำคัญในกลุ่มควบคุม น้ำหนักรวมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยกุ้งที่เลี้ยงด้วย *P. rhodozyma* มีน้ำหนักดีกว่าเบต้า-กลูแคน ความสามารถในการกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดโดยการแช่ เชื้อ *V. harveyi* สายพันธุ์ BP05 หลังจากการแช่ 27 ชั่วโมง กุ้งที่ได้รับอาหารผสม *S. cerevisiae*, *P. rhodozyma* HPPR1 และกลุ่มควบคุม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ไม่ได้แช่ เชื้อ PO activity ในแต่ละกลุ่มแตกต่างกัน โดยกุ้งที่ได้รับอาหารผสม *Phaffia* มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ ได้รับเบต้า-กลูแคนอย่างมีนัยสำคัญ ($P=0.003$)

อย่างไรก็ตามผลการศึกษากการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารต่อการต้านทานเชื้อไวรัส WSSV กลับพบว่า กุ้งที่ได้รับการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหาร 1, 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ไม่สามารถต้านทานไวรัส WSSV ได้ โดยพบว่าภายหลังการฉีดเชื้อไวรัส WSSV เพื่อทดสอบความ คุ่ม โรคแล้วเป็นเวลา 2 วัน กุ้งในทุก ๆ กลุ่ม เริ่มแสดงการตายออกมาให้เห็น และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3-5 ภายหลังการได้รับเชื้อ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวันที่ 6 ภายหลังการฉีดเชื้อ กุ้ง ในกลุ่มควบคุมและกุ้งที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายสะสมเป็น 100% ขณะที่กลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีกุ้งเหลือชีวิตรอดอยู่บ้างแต่ไม่มากนัก โดยมีอัตราการตายสะสมเท่ากับ $90\pm 0.0\%$ และ $96.67\pm 5.16\%$ ตามลำดับ และยังเป็นที่น่าสังเกตว่า ในวันที่ 9 ของการได้รับเชื้อไวรัส มีเพียงกุ้ง ในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ที่ยังมีชีวิตรอด โดยมีอัตราการตายสะสมเป็น $93.33\pm 5.16\%$ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำกุ้งที่เหลือรอดไป ตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSSV ด้วยวิธี One-step PCR ยังพบว่ากุ้งที่เหลือรอดนั้น ยังมีการ ปนเปื้อนของเชื้อไวรัสอยู่อย่างชัดเจน ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากความเข้มข้นของไวรัสที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีความเข้มข้นสูงเกินไปหรืออาจจะเป็นเพราะวิธีการทดสอบความคุ้มโรค

โดยการฉีดไวรัสเข้าไปในตัวกุ้งโดยตรงอาจเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้อาจเป็นเพราะระดับของเบต้า-กลูแคนที่ให้อยู่ยังมีระดับต่ำกว่าระดับที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งให้สามารถต้านทานต่อไวรัสได้

ซึ่งผลของการทดลองครั้งนี้ให้ผลค่อนข้างแตกต่างกับ การทดลองของ Chang *et al.* (2003) ซึ่งพบว่า การเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 1, 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และ ภายหลังทดสอบความคุ้มโรคด้วยเชื้อไวรัส WSSV กุ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 2, 10 และ 20 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดตายในวันที่ 12 ของการฉีดเชื้อเป็น 30.0%, 42.2% และ 24.4% ตามลำดับ และเมื่อตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสของกุ้งที่เหลือด้วยเทคนิค Two-Step PCR ก็ยังพบว่า กุ้งที่เหลือรอดทั้งสามกลุ่มนี้ยังมีกุ้งที่ติดเชื้อ WSSV อยู่ประมาณ 55%, 65% และ 65% ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการทดลองในครั้งนี้ได้ให้อาหารที่มีเบต้า-กลูแคนผสมอยู่ต่ำกว่าและยังใช้เวลาการให้สั้นกว่าด้วย อาจเป็นผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งอยู่ในระดับที่สามารถต้านทานได้เฉพาะในส่วนของแบคทีเรียเท่านั้น แต่ก็ยังไม่สูงพอที่จะสามารถต้านทานต่อการติดเชื้อของไวรัส WSSV ได้

สรุป

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในอวัยวะต่าง ๆ ของกิ้งกูดำปรกติได้แก่ เม็ดเลือด หัวใจ ตับและตับอ่อน กล้ามเนื้อ ลำไส้ส่วนต้น ลำไส้ส่วนกลาง ลำไส้ส่วนท้าย เหงือก และเนื้อเยื่อใต้เปลือก โดยวิธี RT-PCR พบว่ามีการแสดงออกมากในเม็ดเลือด นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในเหงือก หัวใจ ตับและตับอ่อน อาจเพราะเป็นอวัยวะที่มีเลือดไปหล่อเลี้ยงเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่สำคัญ

2. การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้เบต้า-กลูแคนซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม นั้น สามารถกระตุ้นให้กิ้งกูดำมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเพิ่มมากขึ้น โดยพบว่าการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับดังกล่าวจะมีผลให้มีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทุกชนิดที่ทำการประเมิน โดยการใช้เทคนิค RT-PCR อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีนเหล่านี้ยังไม่มีการแสดงออกมาเป็นรูปแบบ (Pattern) เดียวกัน โดยพบว่าในช่วงวันที่ 1 - 3 ยีนในกลุ่ม SPI, Peroxinectin, Lysozyme, β GBP, AMP, Crustin, Penaeidin และ ProPO มีการแสดงออกสูงในกิ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร ขณะที่ในวันที่ 7 กิ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร จะมีแนวโน้มในการเพิ่มการแสดงออกของยีน AMP และ Crustin สูงกว่ายีนในกลุ่มอื่น และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 14 วัน ก่อนการทดสอบความคุ้มโรคกับเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ยีน TGase, Peroxinectin, β GBP, AMP, Penaeidin และ ProPO ในกิ้งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มของการแสดงออกของยีนเหล่านี้สูงกว่ากิ้งที่ไม่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในภาพรวมแล้วนอกจากเบต้า-กลูแคนจะไปมีผลกระตุ้นให้กิ้งกูดำมีการตอบสนองโดยการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแล้วในหลาย ๆ รายงานยังพบว่าเบต้า-กลูแคน ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการดักจับกินเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้นและยังพบว่าเบต้า-กลูแคนยังสามารถกระตุ้นให้กิ้งมีการเพิ่มปริมาณเม็ดเลือด และการเพิ่มการผลิตสารหรือเอนไซม์สำคัญในการทำลายเชื้อโรคบางชนิด ในระบบหมุนเวียนเลือด ซึ่งเม็ดเลือดนั้นเป็นที่ทราบแล้วว่าเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยตรง กลไกเหล่านี้จึงมีส่วนสำคัญที่ช่วยให้

กึ่งกลุ่ด้ามีความสามารถในการต้านทานโรคและตอบสนองต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในร่างกายได้ดียิ่งขึ้น

3. ผลจากการศึกษาการเสริมเบต้า-กลูแคนในอาหาร ต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียและไวรัสพบว่า กึ่งกลุ่ด้าที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหาร โดยเฉพาะในระดับ 3 และ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สามารถต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม และกึ่งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม สอดคล้องกับการทดลองการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในการทดลองข้างต้น ซึ่งสะท้อนให้เห็นอย่างชัดเจนถึงบทบาทที่สำคัญของยีนกลุ่มดังกล่าวในการทำหน้าที่ในการต้านทานการบุกรุกของเชื้อแบคทีเรียเรืองแสง อย่างไรก็ตามในการทดสอบกับเชื้อไวรัส WSSV นั้น กลับให้ผลที่ไม่น่าพอใจนักเนื่องจาก กึ่งในกลุ่มที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในอาหารในระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เท่านั้น ที่เหลือรอดเพียง 2 ตัว จากทั้งหมด 30 ตัว อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการติดเชื้อในกึ่งที่เหลือ ยังคงพบว่ากึ่งดังกล่าวยังคงมีการติดเชื้อในระดับที่สูงอยู่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของไวรัสมีความเข้มข้นสูงเกินไป หรืออาจจะเป็นวิธีการทดสอบความคุ้มโรคโดยการฉีดไวรัสเข้าไปในตัวกึ่งโดยตรงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้อาจเป็นเพราะระดับของเบต้า-กลูแคนและระยะเวลาที่ให้ยังมีระดับต่ำกว่าระดับที่สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งให้สามารถต้านทานต่อไวรัสได้

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า β -glucan ที่เสริมในอาหารสามารถกระตุ้นให้กึ่งกลูตาดีมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่ทำการศึกษามาก มีการแสดงออกที่สูงขึ้น และสอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานเชื้อแบคทีเรียเรืองแสงที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากในปัจจุบันการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกึ่งกลูตาดีมีอยู่ค่อนข้างจำกัด โดยเฉพาะการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวกึ่งกับเชื้อโรค (Pathogen-host relationship) นอกจากนี้การใช้ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งกลูตาดีมีเพียง 10 ยีน ศึกษาการตอบสนองต่อสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันยังไม่สามารถเป็นข้อสรุปของการแสดงออกของระบบภูมิคุ้มกันทั้งหมดได้ ดังนั้น การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกึ่งยังเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้การหาแนวทางป้องกันและรักษาโรคเป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อไปในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรณีกา ขนบตี. 2543. การศึกษาทางโครงสร้างและชีวเคมีในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยมหิดล.

จิรพร เรืองศรี และ กิจการ สุขมาตย์. 2530. การศึกษาการเกิดโรคและความรุนแรงของเชื้อ *Vibrio harveyi* ในกุ้งกุลาดำ. รายงานการวิจัย. คณะทรัพยากรธรรมชาติ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 26 น.

จิราพร เกษรจันทร์, สิทธิ บุญรัตผลิน, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ อุษณีย์ เอกปฏิธานพงศ์. 2538.
ไวรัสรูปแท่งสาเหตุของโรคตัวแดงดาวขาวในกุ้งกุลาดำ. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2538.
สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดสงขลา. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 11 น.

_____. สุดา ต้นทวนิช, เรวัตร คงประดิษฐ์ และ สราวุธ ศรีวัฒนวรัญญู. 2543. ศึกษา
ความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากพ่อแม่กุ้งกุลาดำสู่ลูกกุ้ง.
เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2543. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงทะเลฝั่งอ่าวไทยจังหวัด
สงขลา. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 16 น.

นัทชนัน ศิริไพศาล. 2549. การใช้เบต้ากลูแคนเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei* Boon). วิทยานิพนธ์วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชลอ ลิมสุวรรณ. 2534. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ฐานเศรษฐกิจ จำกัด.
กรุงเทพฯ. 202 น.

_____. 2549. การเลี้ยงกุ้งในปี 2549. Thailandshrimp.com. แหล่งที่มา:
http://www.thailandshrimp.com/op_actworld.html, 29 พฤศจิกายน 2549.

_____. และ พรเลิศ จันทร์รัชชกุล. 2547. อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. ครั้งที่ 1.
บริษัทเมจิก ฟันบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ. 206 น.

คารุณี แซ่อู่, อนันต์ ต้นสุตะพานิช และ ลีลา เรืองแป้น. 2530. *Vibrio harveyi* สาเหตุของโรคแบคทีเรียเรืองแสงของลูกกุ้งแช่บ๊วย (*Penaeus merguensis*). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 6/30. ฝ่ายทดลองและวิจัยเพื่อการเพาะเลี้ยง กุ้งประมงน้ำกร่อย. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 11 น.

ปกรณ อุ่นประเสริฐ. 2531. เทคนิคการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ชอนนทรี, กรุงเทพฯ. 91 น.

ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภูมิ. 2542. การศึกษาพิษเฉียบพลันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ว่ายอ่อนและประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* spp.) และแพลงก์ตอนพืชบางชนิดที่พบในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรเทพ ปลอดภัย. 2537. การศึกษาช่วงระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองในน้ำทะเล และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลีลา เรืองแป้น, วารินทร์ ธนาสมหวัง และ กุลวรา แสงรุ่งเรือง. 2540. แบคทีเรียในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในระบบพัฒนา, น. 3-10. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 (สาขาสัตวแพทย์และประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชร อรรถทิพพหลคุณ และ มนตรี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ. 208 น.

เศรษฐเกียรติ กระจ่างวงษ์, สุพจน์ วัฒนพงศ์ชาติ และ ธนพงศ์ อินทรธนู. 2533. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียในอวัยวะภายในของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2533. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 15 น.

สิทธิ บุญรัตน์ผลิน, สถาพร ดิเรกบุษราคม, จิราพร เกษรจันทร์, อุษณีย์ เอกปนิธารพงศ์, ไชยยุทธ
 จันทนชุกกลิ่น และ กิจการ ศุภมาตย์. 2535. Baculovirus สาเหตุของโรคกุ้งหัวเหลืองในกุ้ง
 กูลาดำ. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2535. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด,
 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

สุมนา คงสม. 2535. การศึกษาการติดเชื้อโมโนคอนบาอูลิวไรรัสและแบคทีเรียในกุ้งกูลาดำ.
 วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ai, Q., M. Kangsen, Z. Lu, T. Beiping, Z. Wenbing, X. Wei and L. Huitao. 2007. Effects of
 dietary β -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena*
crocea. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 394-402.

Aspan, A., M. Hall and K. Soderhall. 1990. The effect of endogeneous proteinase inhibitors on
 the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes.
Insect Biochem. 20: 485-492.

Austin, B. and D.A. Austin. 1987. **Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild
 Fish.** Ellis Horwood, Chichester.

Bachere, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier, and B. Romestand. 2004.
 Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and
 the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunol. Rev.** 198: 149-68.

Bao, Y., Y. Yamano and I. Morishima. 2007. β -1,3-Glucan inducible expression of
 prophenoloxidase-activating proteinase from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*. **Comp.
 Biochem. Physiol. B.** 147: 45-48.

- Bartlett, T.C., B.J. Cuthbertson, E. F. Shepard, R.W. Chapman, P.S. Gross and G.W. Warr. 2002. Crustins, Homologues of an 11.5-kDa Antibacterial Peptide, from Two Species of Penaeid Shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. **Mar. Biotechnol.** 4: 278-293.
- Binder, R.J., D.K. Han, and P.K. Srivastava. 2000. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. **Nat. Immunol.** 1: 151-155.
- Brakk, C.B.T., R. Faber and J.H. Boon. 1996. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978). **Comp. Haematol. Intern.** 6: 194-203.
- Brown, G.D. and S. Gordon. 2005. Immune recognition of fungal β -glucans. **Cell Microbiol.** 7: 471-479.
- Brusca, R.C. and G.J. Brusca. 1990. **Invertebrates**. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Buda, E.S. and H.S. Thomas. 2005. Expression of a serine proteinase homolog prophenoloxidase-activating factor from the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 140: 521-531.
- Burge, E.J., D.J. Madigan, L.E. Burnett and K.G. Burnett. 2007. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio*. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 327-339.
- Campa-Cordova, A.I., N.Y. Hernandez-Saavedra, R. De Philippis and F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** 12: 353-366.

- Carding, S.R., D. Lu and K. Bottomly. 1992. A polymerase chain reaction assay for the detection and quantitation of cytokine gene expression in small numbers of cells. **J. Immunol. Methods** 151: 277-287.
- Cellura, C., M. Toubiana, N. Parrinello and P. Roch. 2006. HSP70 gene expression in *Mytilus galloprovincialis* hemocytes is triggered by moderate heat shock and *Vibrio anguillarum*, but not by *V. splendidus* or *Micrococcus lysodeikticus*. **Dev. Comp. Immunol.** 30: 984-997.
- Chang, C.F., H.Y. Chen, M.S. Su and I.C. Liao. 2000. Immunomodulation by dietary β -1, 3-glucan in the brooders of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** 10: 505-514.
- _____, M.S. Su, H.Y. Chen and I.C. Liao. 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 297-310.
- Chen, M.Y., K.Y. Hu, C.C. Huang and Y.L. Song. 2005. More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 1003-1016.
- Cheng, W., C.H. Liu, S.T. Yeh, J.C. Chen. 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 41-51.
- _____, _____, C.H. Tsai and J.C. Chen. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 18: 297-310.

- Chiou, T.T., J.L. Wu, T.T. Chen, J.K. Lu. 2005. Molecular cloning and characterization of cDNA of penaeidin-like antimicrobial peptide from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Mar. Biotechnol.** 7(2): 119-27.
- _____, J.K. Lu, J.L. Wu, T.T. Chen, C.F. Ko and J.C. Chen. 2007. Expression and characterisation of tiger shrimp *Penaeus monodon* penaeidin (mo-penaeidin) in various tissues, during early embryonic development and moulting stages. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 132–142.
- Chong, Y.C. and H. Loh. 1984. Hepatopancreas chlamydial and parvoviral infections of farmed marine prawns in Singapore. **Singapore Vet. J.** 9: 51-56.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeidin antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442-445.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. Van Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **J. Biol. Chem.** 272: 28398-28406.
- _____, D. Saulnier, J. Garnier, C. Jouffrey, P. Bulet and E. Bachere. 2001. Crustacean immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **J. Biol. Chem.** 276: 47070-47077.
- _____, M. Munoz, C. Cosseau, J. Rodriguez, P. Bulet, M. Comps and E. Bachere. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. **J. Cell Sci.** 113: 461-469.

- Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinase from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycol. Res.** 102: 820-824.
- Enrique, De-la-Re-Vega, A. Garcia-Galaz, M.E. Diaz-Cinco and R.R. Sotelo-Mundo. 2006. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 405-408.
- Flegel, T.W. 1997. Major viral disease of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 433-422.
- _____, S. Sriurairatana, D.J. Morrison and N. Waiyakrutha. 1997. ***Penaeus monodon* captured broodstock surveyed for yellow-head virus and other pathogens by electron microscopy.** Shrimp Biotechnology in Thailand (BIOTEC Publication 2/2540). p. 37-42.
- _____, T. Pasharawipas, L. Nielsen, V. Thamavit and S. Kongtim. 2001. **Effects of hepatopancreatic parvovirus (HPV) monodon baculovirus (MBV) and multiple viral infections on cultivated shrimp in Thailand.** In The 3rd National Symposium on Marine Shrimp. p. 48-63.
- _____, S. Sriurairatana, C. Wongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim and B. withyaehumnaruk. 1997. **Progress in characterization and control of yellow-head virus of *Penaeus monodon*.** Shrimp Biotechnology in Thailand (BIOTEC Publication 2/2540). p. 71-78.

- Fu Y.W., W.Y. Hou, S.T. Yeh, C.H. Li, J.C. Chen. 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 673-685.
- Galindo-Villegas, J. and H. Hosokawa. 2004. **Immunostimulants: Towards temporary Prevention of Diseases in Marine Fish.** Available source: <http://w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/maricultura/vii/pdf/16JorgeGalindo.pdf>, March 17, 2006.
- Gollas-Galvan, T., J. Hernandez-Lopez, and F. Vargas-Albores. 1999. Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 122: 77-82.
- Haug, T., A.K. Kjuul, K. Stensvag, E. Sandsdalen and O.B. Styrvold. 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. **Fish Shellfish Immunol.** 12: 371-385.
- Hauton, C., J.A. Hammond and V.J. Smith. 2005. Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 33-42.
- _____, V. Brockton and V.J. Smith. 2006. Cloning of a crustin-like, single whey-acidic-domain, antibacterial peptide from the haemocytes of the European lobster, *Homarus gammarus*, and its response to infection with bacteria. **Mol. Immunol.** 43: 1490-1496.
- Hernandez-Lopez, J., T. Gollas-Galvan and F. Vargas-Albores. 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). **Comp. Biochem. Physiol.** 113C: 61-6.

- Hideaki, A., O. Ichiro and M. Katsuyoshi. 1993. Cell type-specific roles in the hemocyte clotting system of the spiny lobster, *Panulirus japonicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.** 105: 11-15.
- Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono, and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene** 316: 187-195.
- Holmblad, T. and K. Soderhall. 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture** 172: 111-123.
- Hossain, M.S., A. Chakraborty, B. Joseph, S.K. Otta, I. Karunasagar and I. Karunasagar. 2001. Detection of new hosts for white spot syndrome virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture** 198: 1-11.
- Hsu, P.I., C.H. Liu, D.Y. Tseng, P.P. Lee and W. Cheng. 2006. Molecular cloning and characterisation of peroxinectin, a cell adhesion molecule, from the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 1-10.
- Hu S.Y., J.H. Huang, W.T. Huang, Y.H. Yeh, M.H.C. Chen, H.Y. Gong, T.T. Chiou, T.H. Yang, T.T. Chen, J.K. Lu, J.L. Wu. 2006. Structure and function of antimicrobial peptide penaeidin-5 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture** 260: 61-68.
- Huang, C.C., K. Sritunyaluksana, K. Soderhall and Y.L. Song. 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.
- Huang, X., Z. Hongqi and Z. Hui. 2007. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 750-757.

- Iwanaga, S., Kawabata, S. and Muta, T. 1998. New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. **J. Biochem.** 123: 1–15.
- Jarasrassamee, B., P. Supungul, S. Panyim, S. Klinbunga, V. Rimphanichayakit and A. Tassanakajon. 2005. Recombinant expression and characterization of five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Mar. Biotechnol.** 7: 46-52.
- Jiang, Y.S., W.B. Zhan, S.B. Wang and J. Xing. 2006. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Aquaculture** 253: 114– 119.
- Jimenez-Vega, F., F. Vargas-Albores, K. Soderhall. 2005. Characterisation of a serine proteinase from *Penaeus vannamei* haemocytes. **Fish Shellfish Immunol.** 18: 101-108.
- Jiravanichpaisal, P., P. Narongsak, P. Sasithon, D. Seri, S. Irene and S. Kenneth. 2007. Expression of immune-related genes in larval stages of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Fish Shellfish Immunol.** xx: 1-10.
- Johansson, M.W., P. Keyser, K. Sritunyaluksana and K. Soderhall. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture** 191: 45-52.
- _____, M. I. Lind, T. Holmblad, P.O. Thornqvist and K. Soderhall. 1995. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 216: 1079-1087.
- Kang, C.J., J.F. Xue, N. Liu, X.F. Zhao and J.X. Wang. 2007. Characterization and expression of a new subfamily member of penaeidin antimicrobial peptides (penaeidin 5) from *Fenneropenaeus chinensis*. **Mol. Immunol.** 44: 1535–1543.

- _____, J.X. Wang, X.F. Zhao, X.M. Yang, H.L. Shao and J.H. Xiang. 2004. Molecular cloning and expression analysis of Ch-penaeidin, an antimicrobial peptide from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish Shellfish Immunol.** 16: 513-525.
- Kanost, M.R. 1999. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 291-301.
- Karunasagar, I., R. Pai, G.R. Malathi and I. Karunasagar. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. **Aquaculture** 128: 203-209.
- Khoo, L., D.W. Robinette and E.J. Noga. 1999. Callinectin, an Antibacterial Peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, Hemocytes. **Mar. Biotechnol.** 1:44-51.
- Ko, C.F., T.T. Chiou, V. Baskaralingam, J.K. Lu and J.C. Chen. 2007. Cloning and characterisation of a prophenoloxidase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 12-22.
- Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Appl. Physiol.** 92: 2177-2186.
- Kumari, J. and P.K. Sahoo. 2006. Dietary β -1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.) **J. Fish Dis.** 29: 95-101.
- Lai, C.Y., W. Cheng, and C.M. Kuo. 2005. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 18:417-430.

- Lanz, H., S. Hernandez, E. Garrido-Guerrero, V. Tsutsumi and H. Arechiga. 1993. Prophenoloxidase system activation in the crayfish *Procambarus clarki*. **Dev. Comp. Immunol.** 17: 399-406.
- Lavilla-Pitogo, C.R., M.C.L. Baticados, E.R. Cruz-Lacierda and L.D. de la Pena. 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. **Aquaculture** 91: 1-13.
- Lee, S.Y. and K. Soderhall. 2001. Characterization of a Pattern Recognition Protein, a Masquerade-Like Protein, in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **J. Immunol.** 166: 7319–7326.
- Liang, Z. and K. Soderhall. 1995. Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 112: 385-391.
- Lightner, D.V. 1996. **A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp.** World Aquaculture Society, World Aquaculture Society. 304 p.
- _____ and R.M. Redman. 1981. A baculovirus-caused disease of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. **J. Inver. Parthol.** 38: 299-302.
- _____ and _____. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture** 164: 201-220.
- Lin, C.Y., K.Y. Hu, S.H. Ho, Y.L. Song. 2006. Cloning and characterization of a shrimp clip domain serine protease homolog (c-SPH) as a cell adhesion molecule. **Dev. Comp. Immunol.** 30: 1132-1144.

- Liu, C.H., W. Cheng and J.C. Chen. 2005. The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. **Fish Shellfish Immunol.** 18: 431-444.
- _____, _____, C.M. Kuo and J.C. Chen. 2004. Molecular cloning and characterisation of a cell adhesion molecule, peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 13-26.
- _____, S.P. Yeh, C.M. Kuo W. Cheng, C.H. Chou. 2006. The effect of sodium alginate on the immune response of tiger shrimp via dietary administration: Activity and gene transcription. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 442-452.
- Liu, J., W.J. Yang, X.J. Zhu, N.K. Karouna-Renier and R.K. Rao. 2004. Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Cell Stress Chaperones.** 9: 313-323.
- Liu, Y.C., F.H. Li, B. Wang, B. Dong, Q.L. Zhang, W. Luan, X.J. Zhang and J.H. Xiang. 2007. A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 576-588.
- Lo, C.F., Leu, J.H., Chen, C.H., Peng, S.E., Chen, Y.T., Chou, C.M., Yeh, P.Y., Huang, C.J., Chou, H.Y., Wang, C.H. and Kou, G.H. 1996. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Dis. Aquat. Org.** 25: 133-141.
- Lo, W.Y., K.F. Liu, I.C. Liao and Y.L. Song. 2004. Cloning and molecular characterization of heat shock cognate 70 from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Cell Stress Chaperones.** 9: 332-343.

- Lotz, J.M. 1997. Special topic review: Viruses, biosecurity and specific pathogen-free stocks in Shrimp aquaculture. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 405-413.
- Marone, M., S. Mozzetti, D. De Ritis, L. Pierelli and G. Scambia. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online.** 3: 19-25.
- Mohney, L.L., D.V. Lightner and T.A. Bell. 1994. An epizootic of vibriosis in Ecuadorian Pond-reared *Penaeus vannamei* Boon (Crustacean: Decapoda). **J. World Aqua. Soc.** 25: 116-125.
- Munoz, M., F. Vandenbulcke, D. Saulnier and E. Bachere. 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **Eur. J. Biochem.** 269: 2678-2689.
- _____, _____, Y. Gueguen and E. Bachere. 2003. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 283-289.
- _____, _____, J. Garnier, Y. Gueguen, P. Bulet, D. Saulnier and E. Bachere. 2004. Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio. **Cell. Mol. Life Sci.** 61: 961-972.
- Nash, G., A. Arkarjamon and B. Withyachumnarnkul. 1997. **Histological and rapid haemocytic diagnosis of yellowhead disease in *Penaeus monodon*.** Shrimp Biotechnology in Thailand (BIOTEC Publication 2/2540). p. 93-102.
- Noga, E. J., T.A. Arroll and Z. Fan. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. **Fish Shellfish Immunol.** 6: 403-412.

- Okumura, T. 2007. Effects of lipopolysaccharide on gene expression of antimicrobial peptides (penaeidins and crustin), serine proteinase and prophenoloxidase in haemocytes of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 22: 68-76.
- Paulsen, S. M., R.E. Engstad and B. Robertsen. 2001. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 23-37.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Pillemer, L. and E.E. Ecker. 1940. Anticomplementary factor in fresh yeast. **J. Biol. Chem.** 137: 139-142.
- Potempa, J., E. Korzus, J. Travis. 1994. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. **J. Biol. Chem.** 269: 15957-15960.
- Prayitno, S.B. and J.W. Latchford. 1995. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to *Photobacterium* and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquaculture** 132: 105-112.
- Prohaszka, Z. 2003. Heat shock proteins as chaperones of the immune response. The optimal stress of life. **Orv. Hetil.** 144: 1331-1339.
- Rattanachai, A., I. Hirono, T. Ohira, Y. Takahashi and T. Aoki. 2004. Cloning of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* crustin-like peptide cDNA and analysis of its expression. **Fish. Sci.** 70: 765-771.

- _____, _____, _____, _____ and _____. 2005. Peptidoglycan inducible expression of a serine proteinase homologue from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). **Fish Shellfish Immunol.** 18: 39-48.
- Riggi, S.J. and N.R. Di Luzio. 1961. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. **Am. J. Physiol.** 200: 297-300.
- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia** 18: 571–573.
- Robert, J. 2003. Evolution of heat shock protein and immunity. **Dev. Comp. Immunol.** 27: 449-464.
- Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi and T. Aoki. 2002. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. **Fish Shellfish Immunol.** 13: 69-83.
- Romo-Figueroa, M.G., C. Vargas-Requena, R.R. Sotelo-Mundo, F. Vargas-Albores, I. Higuera-Ciapara, K. Soderhall, and G. Yepiz-Plascencia. 2004. Molecular cloning of a β -glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. **Dev. Comp. Immunol.** 28 (7-8): 713-26.
- Roux, M.M., A. Pain, K.R. Klimpel and A.K. Dhar. 2002. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). **J. Virol.** 76: 7140-7149.
- Ruangpan, L. and T. Kitao. 1991. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius. **J. Fish Dis.** 14: 383-388

- Schemetter, G., C.P. Wolk and J. Elhai. 1986. Expression of luciferase from *Vibrio haveyi* and *Vibrio fischeri* in filamentous cyanobacteria. **J. Bacteriol.** 167: 411-414.
- Scholz, U., G. Garcia Diaz, D. Ricque, L. E. Cruz Suarez, F. Vargas Albores and J. Latchford. 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile *Penaeus vannamei* by supplementation of diets with different yeast products. **Aquaculture** 176: 271-283.
- Schnapp, D., G.D. Kemp and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 240: 532-539.
- Selvaraj, V., K. Sampath, Vaithilingam Sekar. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 114: 15-24
- Shi, Z., C. Huang, J. Zhang, D. Chen and J.R. Bonami. 2000. White spot syndrome virus (WSSV) experimental infection of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. **J. Fish Dis.** 23: 285-288.
- Smith, V.J. and N.A. Ratcliffe. 1980. Cellular defense reactions of the shore crab, *Carcinus maenas*: in vivo hemocytic and histopathological responses to injected bacteria. **J. Inver. Pathol.** 35: 65-74.
- _____, J.H. Brown and C. Hauton. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish Shellfish Immunol.** 15: 71-90.
- Soderhall, K. and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.

- _____, L. Hall, T. Unestam, L. Nyhlen. 1979. Attachment of phenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity. **J. Inver. Pathol.** 34: 285-294.
- Somprasong, N., V. Rimphanitchayakit and A. Tassanakajon. 2006. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. **Dev. Comp. Immunol.** 30: 998-1008.
- Song, Y.L., J.J. Liu, L.C. Chan and H.H. Sung. 1997. Glucan-induced disease resistance in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Dev. Biol. Stand.** 90: 413-421.
- Song, L., L. Wu, D. Ni, Y. Chang, W. Xu and K. Xing. 2006. The cDNA cloning and mRNA expression of heat shock protein 70 gene in the haemocytes of bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819) responding to bacteria challenge and naphthalin stress. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 335-345.
- Sotelo-Mundo, R.R., M.A. Islas-Osuna, E. de-la-Re-Vega, J. Hernandez-Lopez, F. Vargas-Albores and G. Yepiz-Plascencia. 2003. cDNA cloning of the lysozyme of the white shrimp *Penaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 325-331.
- Sritunyalucksana, K. and K. Soderhall. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture** 191: 53-69.
- _____, L. Cerenius and K. Soderhall. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23: 179-186.
- _____, S.Y. Lee and K. Soderhall. 2002. A β -1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 237-245.

- _____, K. Wongsuebsantati, M.W. Johansson and K. Soderhall. 2001. Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the proPO system from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 353-363.
- Su, J., L. Song, W. Xu, L. Wu, H. Li and J. Xiang. 2004. cDNA cloning and mRNA expression of the lipopolysaccharide- and β -1,3-glucan-binding protein gene from scallop *Chlamys farreri*. **Aquaculture** 239: 69-80.
- Sukhumsirichart, W., C. Woongteerasupaya, V. Boonsaeng, S. Panyim, S. Sriurairatana, B. Withyachumnarnkaul and T.W. Flegel. 1999. Characterization and PCR detection of hepatopancreatic parvovirus (HPV) from *Penaeus monodon* in Thailand. **Dis. Aquat. Org.** 38: 1-10.
- Suphantharika, M., P. Khunrae, P. Thanardkit and C. Verduyn. 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Bioresour. Technol.** 88: 55-60.
- Supungul, P., S. Klinbunga, R. Pichyangkura, I. Hirono, T. Aoki and A. Tassanakajon. 2004. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. **Dis. Aquat. Org.** 61: 123-135.
- Sveinbjornsson, B. and R. Seljelid. 1994. Aminated β -1,3-D-polyglucose activates salmon pronephros macrophages in vitro. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 41: 113-23.
- Van Hulten, M.C. and J.M. Vlask. 2001. Identification and phylogeny of a protein kinase gene of white spot syndrome virus. **Virus Genes.** 22: 201-207.
- _____, R.W. Goldbach and J.M. Vlask. 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. **J. Gen. Virol.** 81: 2525-2529.

- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. β glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- _____, F. Jimenez-Vega and K. Soderhall. 1996. A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by β -1,3-glucan. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 299-306.
- _____, _____, and G.M. Yepiz-Plascencia. 1997. Purification and comparison of β -1,3-glucan binding protein from white shrimp (*Penaeus vannamei*). **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 116: 453-458.
- _____, G. Yepiz-Plascencia, F. Jimenez-Vega and A. Avila-Villa. 2004. Structural and functional differences of *Litopenaeus vannamei* crustins. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 138: 415-422.
- Vaseeharan, B., Y.C. Lin, C.F. Ko, J.C. Chen. 2006. Cloning and characterisation of a serine proteinase from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Fish Shellfish Immunol.** 21: 20-31.
- Wang, Q., B.T. Poulos and D.V. Lightner. 2000. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Arch. Virol.** 145: 263-274.
- Wang, R., Z. Liang, M. Hall and K. Soderhall. 2001. A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localisation and cDNA cloning. **Fish Shellfish Immunol.** 11: 623-637.
- Wang, S.H. and J.C. Chen. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 19: 191-204.

- Wang, Y.C., P.S. Chang, and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 414-418.
- Wongteerasupaya, C., S. Sriurairatana, J.E. Vickers, A. Akrajamorn, V. Boonsaeng, S. Panyim, A. Tassanakajon, B. Withyachumnarnkul and T.W. Flegel. 1995. Yellow head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. **Dis. Aqua. Org.** 22: 45-50.
- Xie, X., H. Li, L. Xu and F. Yang. 2005. A simple and efficient method for purification of intact white spot syndrome virus (WSSV) viral particles. **Virus Res.** 108: 63-67.
- Yamuna, A., V. Kabila and P. Geraldine. 2000. Expression of heat shock protein 70 in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) following exposure to Hg and Cu. **Indian J. Exp. Biol.** 38: 921-925.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen, and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable proteins of tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and related species. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 121: 169-176.
- _____, L.R. Kao, C.J. Huang and I.H. Tsai. 2006. Biochemical characterization and cloning of transglutaminases responsible for hemolymph clotting in *Penaeus monodon* and *Marsupenaeus japonicus*. **Biochim. Biophys. Acta** 1764: 1167-1178.
- Zhang, J., F. Li, Z. Wang and J. Xiang. 2007. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **J. Biotechnol.** 127: 605–614.
- Zhu, L., L. Song, Y. Chang, W. Xu, L. Wu. 2006. Molecular cloning, characterization and expression of a novel serine proteinase inhibitor gene in bay scallops (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 320-331.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase Soy Agar/Broth (TSA/TSB) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง TSA/TSB 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

2. Thiosulfate Citrate Bile-Salt Sucrose Agar (TCBS) ปริมาตร 1 ลิตร

ชั่ง TCBS 88 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือด

สารเคมีที่ใช้

1. Anticoagulant

Tri-sodium citrate dihydrate	4.0	กรัม
RPMI Medium 1640, GIBCO™	40.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันแล้วจึงนำไปเก็บที่ -4 องศาเซลเซียส

2. PBS buffer (ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

NaCl	8.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH ให้ได้ประมาณ 7.4 ด้วยกรดเกลือเข้มข้น (Conc. HCl) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

3. 1.5 % Agarose Gel

ชั่ง Agarose ใส่ในบัฟเฟอร์ TBE (1 X) ให้มีความเข้มข้น 1.5% ต้มจนกระทั่ง Agarose ละลายในบัฟเฟอร์เป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ให้เย็นลงถึงประมาณ 60 องศาเซลเซียส นำไปเทลง Gel Chamber ที่มี Comb ตั้งอยู่เรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้จน Agarose แข็งตัวจึงดึง Comb ออกและเท TBE (1X) จนท่วม gel เล็กน้อย

4. 5x TBE (Tris-Borate-EDTA) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA (pH 8.0)	20.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

5. 10 X Loading dye

Ficol 400	7.5	กรัม
Bromphenol blue	0.125	กรัม
เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	50.0	มิลลิลิตร

ใส่ใน Eppendorf tube แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

6. Ethidium bromide (5 µg/ml)

ในการย้อม Agarose gel ควรทำเป็น Stock solution โดยละลายผง Ethidium bromide ด้วยน้ำ deionized ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเตรียมความเข้มข้นเพื่อใช้สำหรับย้อม Agarose gel ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7. Marker 100 bp ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

100 bp DNA Ladder plus	10	ไมโครลิตร
6x Loading dye solution	10	ไมโครลิตร
Distilled water	40	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	60	ไมโครลิตร

ตารางผนวกที่ 1 อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในปริมาณต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi*

ชุดการทดลอง	วันที่					
	1	2	3	4	5	6
กลุ่มควบคุม	0.00±0.00 ^{ns}	33.33±0.89 ^b	38.83±0.52 ^b	44.50±0.52 ^b	50.00±0.89 ^b	55.50±1.37 ^b
เบต้า-กลูแคน 1 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	27.83±0.52 ^{ab}	44.50±0.52 ^b	44.50±0.52 ^b	50.00±0.00 ^b	55.50±0.52 ^b
เบต้า-กลูแคน 3 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	33.33±0.00 ^b	44.50±0.52 ^b	50.00±0.00 ^b	50.00±0.00 ^b	50.00±0.00 ^b
เบต้า-กลูแคน 5 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	11.17±0.52 ^a	11.17±0.52 ^a	11.17±0.52 ^a	11.17±0.52 ^a	22.17±0.52 ^a

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วันที่					
	7	8	9	10	11	12
กลุ่มควบคุม	55.50±1.37 ^b	66.67±0.89 ^b	72.17±1.03 ^b	72.17±1.03 ^b	72.17±1.03 ^b	72.17±1.03 ^b
เบต้า-กลูแคน 1 กรัม	61.17±0.52 ^b					
เบต้า-กลูแคน 3 กรัม	50.00±0.00 ^b	55.50±0.52 ^b				
เบต้า-กลูแคน 5 กรัม	27.83±0.52 ^a	27.83±0.52 ^a	27.83±0.52 ^a	33.33±0.00 ^a	33.33±0.00 ^a	33.33±0.00 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ 2 อัตราการตายสะสมเฉลี่ย (เปอร์เซ็นต์) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเบต้า-กลูแคนในปริมาณต่าง ๆ หลังฉีดเชื้อ White Spot Syndrome Virus

ตัวอย่าง	วันที่						
	1	2	3	4	5	6	7
กลุ่มควบคุม	0.00±0.00 ^{ns}	6.70±1.03 ^a	30.00±0.89 ^a	80.00±0.89 ^{ab}	96.70±0.52 ^a	96.70±0.52 ^a	100.00±0.00 ^b
เบต้า-กลูแคน 1 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.89 ^a	56.70±2.07 ^a	90.00±0.89 ^b	90.00±0.89 ^a	93.30±0.52 ^a	100.00±0.00 ^b
เบต้า-กลูแคน 3 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	10.00±0.00 ^a	46.70±1.03 ^a	66.70±0.52 ^a	86.70±0.52 ^a	86.70±0.52 ^a	90.00±0.00 ^a
เบต้า-กลูแคน 5 กรัม	0.00±0.00 ^{ns}	20.00±0.00 ^a	50.00±0.89 ^a	93.30±1.03 ^b	93.30±1.03 ^a	96.70±0.52 ^a	96.70±0.52 ^b

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่าง	วันที่						
	8	9	10	11	12	13	14
กลุ่มควบคุม	100.00±0.00 ^b	100.00±0.00 ^{ns}					
เบต้า-กลูแคน 1 กรัม	100.00±0.00 ^b	100.00±0.00 ^{ns}					
เบต้า-กลูแคน 3 กรัม	90.00±0.00 ^a	90.00±0.00 ^{ns}	93.30±0.52 ^{ns}				
เบต้า-กลูแคน 5 กรัม	90.67±0.52 ^b	100.00±0.00 ^{ns}					

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ประวัติการศึกษา

ชื่อ –นามสกุล

นางสาวจรรุวรรณ ชินกร

วัน เดือน ปี ที่เกิด

วันที่ 30 มีนาคม 2525

สถานที่เกิด

กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

วท.บ. (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์